Sz.

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. Els., **C. von Noorden**-Wien, **E. Salkowski**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Sechsundvierzigster Band.

Ausgegeben am 9. November 1912.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.







Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Röhmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Sechsundvierzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.



Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Über den respiratorischen Quotienten bei Säurevergiftung.

Von

Otto Porges.

(Aus der I. mediz. Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 7. August 1912.)

In einer früheren Arbeit konnte ich zeigen, daß der respiratorische Quotient nach Ausschaltung der Leber auf Werte zwischen 0,9 und 1,0 ansteigt[1]). Diese Theorie verwendete ich im Sinne der von Nasse, Chauveau, Seegen, in letzter Zeit besonders von v. Noorden vertretenen, der zufolge Zucker und dessen Derivate die einzige direkte Kraftquelle der Muskulatur sind, Eiweiß und Fett dagegen nur nach Umwandlung in Kohlenhydrat durch die Leber zu Kraftzwecken herangezogen werden können. Ist die Leber ausgeschaltet, so kann dieser Theorie gemäß Eiweiß und Fett nicht mehr angegriffen werden, der respiratorische Quotient muß den Wert ausschließlicher Kohlenhydratverbrennung (1,0) erreichen. In Gemeinschaft mit Salomon haben wir weiter analoge Versuche an Hunden, denen vorher das Pankreas exstirpiert worden war, ausgeführt und aus dem nach der Leberausschaltung beobachteten Ansteigen des respiratorischen Quotienten geschlossen, daß beim Pankreasdiabetes die Zuckerverbrennung nicht gestört ist. Im übrigen läßt sich auch schon auf Grund des Ergebnisses der Leberausschaltung bei normalen Tieren die Theorie einer gestörten Zuckerverbrennung beim Diabetes ablehnen, denn wenn man den Zucker als die einzige direkte Kraftquelle

[1]) Diese Zeitschr. 27, 131, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 27, 143, 1910.

der Muskulatur ansieht, dann muß man beim diabetischen Organismus ungestörte Verbrennbarkeit des Zuckers postulieren, sonst würden Funktionsstörungen der Muskeln in Erscheinung treten, die de facto beim Diabetes nie beobachtet worden sind.

Gegen meine Versuchsanordnung sowohl, als auch gegen die aus unsern Ergebnissen gezogenen Schlüsse zugunsten der erwähnten Theorie sind von vielen Seiten Einwände erhoben worden, die jedoch viel zu allgemein gehalten waren, um eine Entgegnung zu gestatten. Man warf den Versuchen unphysiologische Bedingungen vor, ein Einwand, der sich gegen jede Organausschaltung erheben läßt und in letzter Konsequenz die Beweiskraft jedes vivisektorischen Experiments in Abrede stellen kann. Vorsicht und Kritik in der Beurteilung derartiger Versuche ist ja sicher am Platze, aber daran haben wir es nicht fehlen lassen. Andere Autoren nehmen lieber das Bestehen von bisher nie beobachteten Stoffwechselvorgängen nach der Leberausschaltung an, wie etwa die Bildung von Fett aus Eiweiß, ehe sie unsere Anschauung anerkennen würden, die allerdings den Fehler hat, festgewurzelten Lehrmeinungen zu widersprechen.

Nun hat in jüngster Zeit Rolly[1]) konkretere Einwürfe gegen unsere Versuche erhoben. Er mußte zunächst die Richtigkeit der von uns festgestellten Tatsachen bestätigen, wie außerdem auch Verzar[2]) nach uns mit einer andersartigen Versuchsanordnung zu gleichlautenden Ergebnissen kommt. Rolly bezieht jedoch den Anstieg des respiratorischen Quotienten nach Leberausschaltung auf eine Säuerung des Organismus, und glaubt, diesen Sachverhalt tatsächlich erwiesen zu haben, da das Serum seiner Versuchstiere nach der Leberausschaltung einen geringeren Grad von Alkalescenz zeigte als vorher.

Es ist bekannt, daß die Kohlensäureausscheidung im Gegensatz zur Sauerstoffaufnahme gewissen Schwankungen unterworfen ist, da Blut und Gewebe ein Reservoir für die Kohlensäure bilden, das sich unabhängig von der Kohlensäureproduktion anfüllen und entleeren kann. Fällt die Entleerung des Kohlensäurevorrats in einen respiratorischen Stoffwechselver-

[1]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **105**, 494, 1912. — Münch. med. Wochenschr. **1912**, Nr. 22 und 23.

[2]) Diese Zeitschr. **34**, 52, 1911.

such, so steigt der respiratorische Quotient, und es kann eine gesteigerte Kohlenhydratverbrennung vorgetäuscht werden. Ich habe in unserer Arbeit diese Möglichkeit ausführlich erörtert. Das Niveau der Kohlensäure in Blut und Geweben wird wieder von der Lungenventilation beherrscht, die Lungenventilation durch das Atemzentrum reguliert, das durch Säuren erregbar ist. Dergestalt wirkt die Atmung als Regulator der Blutalkalescenz [Porges, Leimdörfer und Markovici[1])], indem Vermehrung der sauren Valenzen im Blute das Atemzentrum reizt, damit zu gesteigerter Blutlüftung und Kohlensäureausfuhr führt, was eine Herabsetzung der Kohlensäurespannung und damit der sauren Valenzen zur Folge hat. Eigene ausgedehnte Versuche haben also die Bedeutung der Blutacidität für die Kohlensäurespannung des Blutes und damit für die Kohlensäureausfuhr ergeben, somit hatte ich in erster Linie mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Steigerung des respiratorischen Quotienten nach der Leberausschaltung eine Folge eventuell auftretender Säuerung ist. Ich hatte in der frühern Arbeit kurz auseinandergesetzt, weshalb eine derartige Deutung auszuschließen ist, und will an dieser Stelle noch weitere Argumente anführen. Vor allem reicht die im Blute und in den Geweben angehäufte Kohlensäure gar nicht aus, um die während einer längeren Versuchsperiode gebildete Kohlensäure derart zu vermehren, daß eine erhebliche Steigerung des respiratorischen Quotienten resultiert. Wie ich bereits in meiner Arbeit auseinandergesetzt hatte, leistet schon die Ausdehnung des Versuchs auf einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde Gewähr gegen alle Fehler, die sich aus einer Entleerung der in Blut und Geweben vorrätigen Kohlensäure, durch welche Agenzien immer sie erfolgen mag, ergeben können. Weiter ist die von Rolly selbst beobachtete Herabsetzung der Blutalkalescenz verhältnismäßig unerheblich, der Größe nach mit der von ihm selbst festgestellten Acidosis bei agonalen Zuständen vergleichbar. Die gefundenen Ausschläge wären sicherlich noch geringer, wenn Rolly die Blutalkalescenz 1 bis 3 Stunden nach der Leberausschaltung untersucht hätte (eine Zeitspanne, in die unsere Respirations-

---

[1]) Wiener klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 40. — Zeitschr. f. klin. Med. **73**, 389, 1911.

versuche und auch die meisten von Rolly fallen) und nicht 6 bis 8 Stunden nach der Operation, zu einer Zeit, wo die Tiere sicher schon in extremis waren. Schließlich hat Verzar bei Tieren mit Eckscher Fistel ebenfalls eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten beobachtet, obzwar nach Rolly bei derartig operierten Tieren die Blutalkalescenz ansteigt, somit nach Rolly die entgegengesetzte Veränderung des respiratorischen Quotienten zu erwarten gewesen wäre.

Um aber Rollys Behauptungen endgültig zu entkräften, habe ich eigene Versuche[1]) ausgeführt, die den Einfluß höchstgradiger Säurevergiftung auf den respiratorischen Quotienten demonstrieren.

Die Technik und Anlage der Versuche ist genau die gleiche wie bei den Leberausschaltungsversuchen. 2 bis 4 kg schwere Kaninchen wurden 24 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme mit Urethan (1 g pro kg Körpergewicht) narkotisiert, $^1/_2$ Stunde nach der Urethanzufuhr aufgebunden; dann wurde die Trachea und die Vena jugularis präpariert, eine Trachealkanüle und eine Venenkanüle eingeführt. Die Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels erfolgte nach dem Zuntz-Geppertschen Verfahren. Zunächst wurde zur Bestimmung des normalen respiratorischen Quotienten ein Vorversuch ausgeführt, dann begann der Säureeinlauf in die Vene, einige Minuten nach Beginn des Einlaufes wurde mit der Probenahme für den eigentlichen Versuch begonnen. Der Versuch selbst erstreckte sich wie die Leberausschaltungsversuche auf ca. 1 Stunde. Als saure Substanz gelangte Mononatriumphosphat in 10%iger Lösung (in einem der Versuche in 5%iger Lösung) zur Verwendung; Spiro[2]) hatte gezeigt, daß diese Substanz zur Erzeugung der Säurevergiftung bei intravenöser Applikation am besten geeignet ist. Die Lösung lief während der Versuche kontinuierlich ein. Zeigten sich bedrohliche Vergiftungssymtome (hochgradige Tachypnoe und Tachycardie, Erlöschen des Cornealreflexes), so wurde der Einlauf mitunter für einige Minuten bis zur Erholung des Tieres unterbrochen.

Nebenstehende Tabelle illustriert das Ergebnis der Versuche.

Es zeigte sich somit, daß selbst maximale Säurevergiftung bei dieser Versuchsanordnung den respiratorischen Quotienten verhältnismäßig nur wenig erhöht, bei weitem nicht in dem Maße wie die

---

[1]) Die ausführlichen Protokolle der Versuche werden in einer Arbeit von A. Leimdörfer erscheinen, die die Ergebnisse in anderer Richtung verwendet.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 269, 1902.

Tabelle.

Vers.-Nr.	Zugeführte Säuredosis (NaH_2PO_4) g	Respir. Quotient vor der Säureverg.	Respir. Quotient nach der Säureverg.
1	1,415	0,693	0,809
2	5,27	0,668	0,722
3	4,19	0,760	0,885
4	4,35	0,615	0,817
5	4,2	0,598	0,708
Mittel	—	0,679	0,788

Leberausschaltung. Denn es ergab sich bei den Säurevergiftungsversuchen ein Anstieg im Mittel von 0,679 auf 0,788 bei den in derselben Art ausgeführten Leberausschaltungsversuchen im Mittel von 0,717 auf 0,920. Selbst wenn daher die Leberausschaltung eine maximale Säurevergiftung bewirken würde, so könnte der respiratorische Quotient durch die Säurewirkung allein bei weitem nicht in dem Maße ansteigen, als wir wirklich beobachtet haben[1]). Wir sind daher gezwungen, als Ursache des abnorm hohen respiratorischen Quotienten nach Leberausschaltung eine im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch vermehrte Bildung von Kohlensäure anzunehmen. Und solange nicht andersartige, besondere Stoffwechselvorgänge bewiesen sind, haben wir das Recht, die beobachtete Erscheinung als erhöhte Kohlenhydratverbrennung zu deuten. Wenn wir dieses Versuchsergebnis im Sinne der Theorie, die den Zucker als die einzige direkte Kraftquelle annimmt, auslegen, so sind wir uns wohl bewußt, diese Theorie nicht definitiv bewiesen zu haben; wir glauben jedoch, daß dieselbe durch unsere Versuche erheblich an Boden gewinnt.

Wir haben weiter auf Grund unserer Versuche die Anschauung von der Unverbrennbarkeit der Kohlenhydrate beim Diabetes abgelehnt. Diese Theorie entbehrt bis jetzt jeder tatsächlichen Grundlage und ist allein nicht einmal imstande, die Hyperglykämie beim Diabetes mellitus zu erklären, denn

[1]) Versuch 2, der im Gegensatz zu den 1stündigen Versuchen 2 Stunden dauerte, zeigt den geringsten Anstieg des respiratorischen Quotienten. Rollys Versuche dauerten mehrere Stunden!

wenn verminderte Zuckerverbrennung an sich Hyperglykämie erzeugen würde, so müßte der Zustand der Muskelruhe, der im Verhältnis zur Muskelarbeit mit herabgesetztem Zuckerverbrauch einhergeht, zu Hyperglykämie und Glucosurie führen. Es muß daher auch die Theorie einer gestörten Zuckerverbrennung eine sekundär gesteigerte Zuckerproduktion zur Erklärung der Tatsachen annehmen. Wenn daher der Vorwurf erhoben worden ist, daß das Wiederaufnehmen der Zuckerüberproduktionstheorie des Diabetes Verwirrung in die Diabetesfrage bringt, so können wir antworten, daß diejenige Theorie den Vorzug verdient, die als die einfachere gleichzeitig durch noch so indirekte experimentelle Beweise gestützt ist.

Durch Katalysatoren bewirkte asymmetrische Synthese.

Von

G. Bredig und P. S. Fiske.

(Aus dem Laboratorium für physikalische Chemie und Elektrochemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.)

(Eingegangen am 12. September 1912.)

A. Einleitung.

Vor einiger Zeit hat der eine von uns in Gemeinschaft mit K. Fajans[1]) gezeigt, daß man den asymmetrischen Abbau optisch-inaktiver Substrate durch Enzyme, durch welchen optisch-aktive Abbauprodukte erhalten werden, auch durch Katalysatoren bekannter Zusammensetzung nachahmen kann. So wurde ein optisch-inaktives Gemisch von d- und l-Camphocarbonsäure durch die katalytische Einwirkung von Alkaloiden wie Chinin oder Chinidin in der Weise in Campher und Kohlensäure zerlegt, daß einer der beiden Antipoden schneller als der andere zersetzt bzw. gebildet wurde, so daß ein optisch-aktives Produkt aus optisch-inaktivem Material durch katalytischen Abbau erhalten werden konnte. Es war das ein völliges Analogon zu der Wirkung von Fermenten, wie z. B. der Lipase auf Mandelsäureester, wobei ebenfalls durch Abbau des optisch-inaktiven Esters optisch-aktive Mandelsäuren nach Dakin[2]) erhalten werden.

Bei den genannten Vorgängen sind jedoch in den abzubauenden Stoffen asymmetrische Kohlenstoffatome, wenn auch

---

[1]) G. Bredig und K. Fajans, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 752, 1908. — K. Fajans, Zeitschr. f. physikal. Chem. **73**, 25, 1910.

[2]) H. D. Dakin, Journ. of Physiol. **30**, 253, 1904; **32**, 199, 1905.

d-Form und l-Form in gleicher Menge, schon ursprünglich vorhanden. Besonders interessant aber (wenn auch theoretisch, wie Fajans auf Anregung des einen von uns gezeigt hat, prinzipiell wenig verschieden) ist der Fall, daß bei der Reaktion selbst erst neue asymmetrische Kohlenstoffatome synthetisch gebildet werden, und zwar der eine Antipode in größerer Menge als der andere, so daß auch hierbei optische Aktivität auftritt. Für solche Fälle hatte bekanntlich E. Fischer den Begriff der „asymmetrischen Synthese" geprägt[1]). Direkt aus optisch-inaktivem Material ohne asymmetrische Kohlenstoffatome hat L. Rosenthaler[2]) in seinen schönen Untersuchungen über „Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen" optisch-aktive Substanzen mit asymmetrischem Kohlenstoffatom synthetisch erhalten, und zwar unter der katalytischen Wirkung von Emulsin aus Blausäure und Benzaldehyd rechtsdrehendes Mandelsäurenitril und hieraus linksdrehende Mandelsäure.

Um die im letzten Jahrzehnt immer mehr nachgewiesene Ähnlichkeit und gegenseitige Ersetzbarkeit[3]) von Fermenten und von gewöhnlichen Katalysatoren bekannter Zusammensetzung möglichst weitgehend auch bis zu den stereochemischen Spezifitäten hin nachzuweisen, haben wir uns nun die Aufgabe gestellt, möglichst eine asymmetrische Synthese, wie sie Rosenthaler durch ein Enzym bewirkt hatte, unsererseits auch durch die Wirkung von Katalysatoren bekannter Zusammensetzung zu finden. Dabei ist es uns sogar gelungen, gerade dieselbe Synthese, die Rosenthaler durch das Enzym Emulsin asymmetrisch gestaltet hat, mit unserem Prinzipe durch Katalysatoren bekannter Zusammensetzung ebenfalls asymmetrisch zu gestalten. Auch wir haben die Reaktion

$$C_6H_5.CHO + HCN = C_6H_5.CH(OH).CN$$

[1]) Literatur zur Geschichte der asymmetrischen Synthese siehe: K. Fajans, l. c., S. 69. — L. Rosenthaler, diese Zeitschr. 14, 238, 1908.

[2]) L. Rosenthaler, l. c.

[3]) Vgl. Physikal. Chem. der Fermente von R. O. Herzog in Oppenheimers „Die Fermente", 3. Aufl., 1910, Leipzig; ebenso E. Stern in Oppenheimers Handb. d. Biochem. IV (2), S. 529. — R. Hoeber, Physikal. Chem. der Zelle und der Gewebe, 3. Aufl., 1911, Leipzig, S. 553.

benutzt. Da diese bekanntlich[1]) durch Stoffe basischer Natur ganz erheblich beschleunigt wird, so lag es nahe, das nach J. H. van't Hoff und Emil Fischer vermutlich asymmetrisch gebaute Enzym bei seiner katalytischen Wirkung zu ersetzen durch eine Base von bekannter Zusammensetzung, aber auch von asymmetrischer Struktur, also z. B. durch optisch-aktive Alkaloide.

B. Asymmetrische Synthese optisch-aktiver Mandelsäurenitrile und optisch-aktiver Mandelsäuren durch Katalysatoren bekannter Zusammensetzung.

Der Plan der Versuche war sehr einfach: Wir wollten dieselbe Reaktion wie Rosenthaler studieren, nur wollten wir als katalytisches Hilfsmittel zur Bildung des Cyanhydrins anstatt des Emulsins zunächst die Alkaloide Chinin und Chinidin anwenden. Es handelte sich also nunmehr darum, Benzaldehyd und Blausäure bei Gegenwart eines Alkaloides eine Zeitlang miteinander reagieren zu lassen, dann das Alkaloid zu entfernen und die eventuell vorhandene optische Aktivität des gebildeten Cyanhydrins zu prüfen. Rosenthaler hatte eine wässerige Lösung, durch Zusatz von Alkohol homogen gemacht, benutzt. Zwecks leichterer Entfernung des Alkaloids schien es uns in unserem Falle passender, in den Vorversuchen eine toluolische, später eine chloroformische Lösung zu benutzen, das Alkaloid durch Ausschütteln mit einer wässerigen anorganischen Säurelösung zu entfernen, dann die nichtwässerige Schicht auf optische Aktivität zu prüfen und schließlich das darin vorhandene Cyanhydrin zu Mandelsäure zu verseifen.

Trotz der theoretischen Einfachheit der Methode trat zuerst eine unerwartete Schwierigkeit auf: es war nämlich nicht möglich, mittels Salzsäure, die in den ersten Versuchen angewandt wurde, das Alkaloid aus der nichtwässerigen Schicht wieder zu entfernen. Näheres über dieses überraschende Phänomen wird

---

[1]) A. Lapworth, Journ. chem. Soc. **83**, 995, 1903; **85**, 1206, 1904. — A. J. Ultée, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 1856, 1906. — E. Stern, Zeitschr. f. physikal. Chem. **50**, 513, 1905. — E. Knoevenagel und P. Schlüchterer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 4065, 1904. — P. Wirth, Arch. d. Pharmazie **249**, 382, 1911.

später in Kap. D angegeben werden. Vorläufig genügt es zu erwähnen, daß es erst durch Ausschütteln mit wässeriger Schwefelsäure, in einer Konzentration von etwa 4-normal und in etwa 600fachem Überschuß angewandt, gelang, das Alkaloid praktisch vollständig zu entfernen, so daß man den Rückstand einwandfrei auf optische Aktivität des erhaltenen Cyanhydrins bzw. der Mandelsäure prüfen konnte.

Versuche.

Aus unseren mehrfachen Versuchsreihen[1]) seien hier zwei parallele „Hauptversuche" (Tabelle I) angeführt, der eine mit Chinin, der andere mit Chinidin als Katalysator. Als Kontrolle werden daneben auch zwei Nullversuche (Tabelle I) mit Chinidin, der eine ohne Blausäure und der andere ohne Benzaldehyd, angegeben, aber in diesen Fällen wurde an Stelle der zweiten Komponente des Cyanhydrins so viel (ca. 8 g) racemische Mandelsäure, als etwa einer gesättigten Lösung derselben entsprach, zugegeben. Diese Nullversuche wurden ausgeführt, um zu zeigen, daß unter den gegebenen Umständen schon fertige Mandelsäure durch eventuelle Einwirkung des Alkaloids nicht aktiviert wird, und andererseits um zu zeigen, daß optisch-aktive Mandelsäure nur dann erhalten wird, wenn sich ihr Nitril erst bei Gegenwart von Alkaloid synthetisch gebildet hatte.

Es wurden 50 ccm Benzaldehyd (also 0,5 Mol) in einem gewöhnlichen 250 ccm-Maßkolben in ca. 170 ccm Chloroform gelöst, hierauf wurden 20 ccm wasserfreier Blausäure (also 0,5 Mol) zugesetzt und das Gemisch eine Stunde lang im Thermostaten bei 25° stehengelassen; dann wurde es bis zur Marke mit Chloroform aufgefüllt und 0,5 g des Alkaloids zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt des Kolbens in einen großen Schütteltrichter gegossen und mit 100 ccm einer ca. 4-normalen wässerigen Lösung von Schwefelsäure 5 Minuten tüchtig geschüttelt. Von jeder Schicht wurde dann eine Probe herausgenommen und im 2 dm-Rohr mit Natriumlicht „polarisiert" (Drehung I). Dann wurde die chloroformische Schicht nochmals mit 100 ccm der Säure behandelt und darauf die beiden Proben wie oben polarisiert (Drehung II). Die chloroformische Schicht wurde dann mit 100 ccm konzentrierter wässeriger Salzsäure bei Zimmertemperatur 1 Stunde stehen gelassen und dann das Chloroform abdestilliert. Außer der wässerigen Schicht blieb (wenn

[1]) Zu den hier gegebenen Versuchen wurden beste Chinin- und Chinidinpräparate der Mannheimer Firma Boehringer & Söhne, zum Teil nochmals umkrystallisiert, verwandt. Eine ausführliche Darstellung unseres sehr viel größeren experimentellen Materials usw. findet man in der im Sommer 1911 von der Eidgen. Technischen Hochschule in Zürich approbierten Dissertation: „Durch Katalysatoren bewirkte asymmetrische Synthese" von Paul Southard Fiske. Zürich 1911. Siehe auch Bredig, Chem.-Zeitg. **35**, 324, 1911.

vorhanden) noch im Kolben etwas freier Benzaldehyd zurück. In diesen beiden Schichten schieden sich beim Abkühlen reichlich Krystalle von Mandelsäure ab. Um aber eine eventuelle Pasteursche Krystallisationstrennung zu vermeiden, wurden zunächst wieder alle Krystalle durch Zusatz von Wasser gelöst, erst dann wurde die wässerige Schicht von dem Benzaldehyd getrennt und letzterer mit Wasser mehrmals ausgewaschen, um alle eventuell vorhandene Mandelsäure daraus zu entfernen. Die wässerige Schicht samt allen Waschwässern wurde dann auf 500 ccm ergänzt und in einem 4 dm-Rohr polarisiert (Drehung III). (Die Nullversuche wurden von hier ab nicht weitergeführt.) Die Lösung wurde dann etwas eingedampft, mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt, das Ganze nochmals zu 500 ccm ergänzt und mit 50 ccm Benzol ausgeschüttelt. Der benzolische Auszug wurde in einem 2 dm-Rohr und die wässerige alkalische Lösung selbst in einem 4 dm-Rohr polarisiert (Drehung IV und V).

Tabelle I.

	Drehung I		Drehung II		Drehung III	Drehung IV	Drehung V
	Chloroformschicht	Wässerige Schicht	Chloroformschicht	Wässerige Schicht			
Nullversuche:							
1. Ohne Blausäure . .	0,00°	+ 2,80°	0,00°	0,00°	– 0,01°	—	—
2. Ohne Benzaldehyd	– 0,02°	+ 2,50°	+ 0,01°	– 0,01°	– 0,01°	—	—
Hauptversuche:							
3. Mit Chinin	+ 0,23°	– 2,24°	+ 0,32°	– 0,18°	– 0,81°	– 0,01°	– 0,60°
4. Mit Chinidin. . . .	– 0,27°	+ 2,43°	– 0,38°	– 0,33°	+ 0,92°	0,00°	+ 0,71°

Wie man schon durch den bloßen Augenschein erkennen konnte, beschleunigen geringe Mengen der Alkaloide die Addition der Blausäure an den Benzaldehyd außerordentlich stark. Da diese Reaktion nämlich mit einer starken Contraction verbunden ist, konnte man diese letztere in derselben Zeit an den mit Alkaloiden versetzten Versuchen sehr deutlich wahrnehmen, während in den Nullversuchen eine solche Contraction nicht sichtbar war.

Außerdem haben wir auch noch auf rein chemischem Wege eine Vorstudie über die Kinetik dieser Reaktion angestellt, indem wir während der Reaktion von Zeit zu Zeit Proben aus dem System zogen und die Menge der noch freien, noch nicht an den Benzaldehyd angelagerten Blausäure zu bestimmen versuchten. Mit der von Rosenthaler benutzten Methode haben wir keine eindeutigen Resultate erhalten können. Diese ist inzwischen auch von P. H. Wirth[1]) in seiner

[1]) l. c. Siehe auch L. Rosenthaler, Arch. d. Pharmazie **249**, 510, 1911.

schönen Arbeit über Gleichgewicht und Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Benzaldehyd und Blausäure in wässeriger Lösung einer Kritik unterzogen worden. Wir sind aber schon vorher, wie in der erwähnten Dissertation von P. S. Fiske nachgelesen werden kann, zu einer anderen, mehr physikalisch-chemischen Methode übergegangen, um durch Ausschüttelung das Stadium der Reaktion in der nichtwässerigen Lösung kinetisch festzustellen. Nähere Mitteilung darüber sei bis zum Abschluß weiterer kinetischer Untersuchung der Reaktion vorbehalten, jedoch sei folgendes mitgeteilt: Die noch freie Blausäure wurde nach der Ausschüttelmethode auf Grund des Verteilungssatzes[1]) bestimmt. Ohne Gegenwart des Katalysators zeigte sich, daß bei 25° 0,1 Mol Benzaldehyd und 0,1 Mol Blausäure, zu 50 ccm Totalvolumen in Toluol gelöst, sich nur mit einer Geschwindigkeit vereinigen, die einer Bindung von nur ungefähr 4 % der vorhandenen Blausäure nach 42 Stunden entsprechen. Unter denselben Bedingungen waren in Gegenwart von nur 0,1 g Chinin als Katalysator nach 24 Stunden mindestens schon 60 % der vorhandenen Blausäure gebunden worden. Genauere Daten sollen durch eine spätere Untersuchung geliefert werden. (Beiläufig ergab sich, daß der Verteilungskoeffizient von Blausäure zwischen Wasser und Toluol bei 25° den Wert 4,256 besitzt.)

Aus Tabelle I erkennen wir, daß die chloroformische Schicht in den Nullversuchen nach Ausschüttelung des Alkaloids mittels Schwefelsäure optisch-inaktiv war, während in den Hauptversuchen, in denen sich Cyanhydrin gebildet hatte, diese chloroformischen Schichten eine erhebliche Drehung zeigten; und zwar zeigt sich hier bei Anwendung des linksdrehenden Chinins als Katalysator eine Rechtsdrehung, bei Anwendung des rechtsdrehenden Chinidins als Katalysator eine Linksdrehung. Da also die betreffenden Alkaloide gerade die entgegengesetzte Drehung als wie die Chloroformschicht besitzen, so kann die Drehung der chloroformischen Schichten nach dem Ausschütteln mit Säure schon aus diesem Grunde nicht etwa auf Spuren zurückgebliebenen Alkaloids zurückgeführt werden, sondern sie muß dem Produkte der von den Alkaloiden katalysierten Reaktion, also dem entstandenen Mandelsäurenitril zugeschrieben werden.

Die Entfernung der Alkaloide läßt sich übrigens auch recht gut durch das Ausbleiben der Fluorescenz in dem wässerigen Säureextrakte erkennen, die bekanntlich bereits Spuren dieser Alkaloide anzeigt. Der Einwand, daß das Drehungsvermögen der chloroformischen Schichten irgendeinem Umlagerungsprodukte

[1]) Vgl. z. B. A. A. Jakowkin, Zeitschr. f. physikal. Chem. 29, 626, 1899.

der Alkaloide vielleicht zuzuschreiben wäre, wird dadurch widerlegt, daß diese Drehung dann ebensogut in den „Nullversuchen" auftreten müßte. Dagegen tritt die Drehung der chloroformischen Schicht, wie man sieht, immer nur bei den Versuchen auf, wo beide Komponenten des Cyanhydrins gleichzeitig vorhanden waren und miteinander reagieren konnten, und niemals bei denen, wo nur eine der Komponenten vorhanden war.

Da wir annehmen, daß diese in der chloroformischen Schicht in den Hauptversuchen aufgetretene optische Aktivität auf ein durch Katalyse entstandenes optisch aktives Cyanhydrin zurückzuführen ist, war es nun auch von Interesse und größter Bedeutung, aus diesem so entstandenen Cyanhydrin optisch-aktive Mandelsäure herzustellen. Mandelsäure besitzt eine ziemlich große spezifische Drehung und läßt sich durch Umkrystallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln sehr gut reinigen. Die Bereitung einer solchen Mandelsäure, rein und optisch aktiv, ist der allerbeste positive Nachweis, daß unsere asymmetrische Synthese in der Tat gelungen ist, d. h. daß wirklich eine Synthese von aktivem Benzaldehydcyanhydrin erhalten war und daß die beobachtete neue Drehung nicht von irgendeinem anderen Produkte der vorhandenen Komponenten der Mischung herrührte. Auch konnte dadurch bestimmt werden, ob diese Synthese in der Tat als eine Katalyse zu betrachten war, denn aus der Größe der Drehung einer Mandelsäurelösung kann man die Menge der entstandenen optisch-aktiven Säure in Molen berechnen und diese mit der angewandten Menge des Katalysators vergleichen, was bei einer Lösung des Cyanhydrins wegen der geringen Stabilität dieses Körpers natürlich nicht gut möglich war.

Aus den unter „Drehung III" in Tabelle I angegebenen Zahlen und der bekannten spezifischen Drehung von Mandelsäure haben wir nun also den Prozentgehalt an optisch-aktiver Säure sowohl in Molen wie in Grammen in folgender Weise berechnet: Die spezifische Drehung der Mandelsäure, die von Marckwald und Meth[1]) bestimmt worden ist, ergibt sich im vorhandenen Konzentrationsgebiete zu

[1]) W. Marckwald u. Meth, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **38**, 801, 1905. Die Zahlen von E. Rimbach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2385, 1899, stimmen damit innerhalb weniger Prozente überein.

$[\alpha]_D = 156$, woraus sich berechnet, daß im obigen Chinidinversuche 0,736 g = 0,0049 Mol d-Säure und im obigen Chininversuche 0,648 g = 0,0043 Mol l-Säure gebildet worden sind. Wenn wir damit nun die zur Synthese angewandte Menge des Alkaloides = 0,0015 Mol vergleichen, so läßt sich daraus die Folgerung ziehen, daß die Erzeugung der optischen Aktivität durch diese Alkaloide nicht in einer zur Alkaloidmenge äquivalenten Menge geschieht, sondern in größerer, so daß sie in der Tat als nichts anderes als ein katalytischer Vorgang betrachtet werden kann.

Aus den unter „Drehung V" in Tabelle I angegebenen Zahlen der alkalischen Mandelsäurelösungen und der bekannten spezifischen Drehung des mandelsauren Natriums ist es ebenfalls möglich, den Gehalt an optisch-aktivem Natriumsalz nochmals auszurechnen und die so berechnete Anzahl Mole der darin enthaltenen optisch-aktiven Mandelsäure mit den oben gefundenen zu vergleichen und diese zu kontrollieren. Die spezifische Drehung von mandelsaurem Natrium ist nach Rimbach[1]) im vorliegenden Konzentrationsgebiete $[\alpha]_D = 103^0$ angegeben. Hieraus ergeben sich für den Chinidinversuch 0,0050 Mole d-Säure und für den Chininversuch 0,0042 Mole l-Säure. Diese vollkommene Übereinstimmung der aus zwei voneinander unabhängigen Messungen in saurer und in alkalischer Lösung berechneten Molekulargehalte an aktiver Säure bietet einen ausgezeichneten Beweis, daß wir es hier in der Tat mit einer Lösung von optisch-aktiver Mandelsäure zu tun haben.

Zudem aber haben auch wir in der nitrilhaltigen Schicht eine optische Drehung gefunden, die das entgegengesetzte Vorzeichen besitzt, wie die daraus durch Verseifung erhaltene Mandelsäure. Gerade dieselbe optische Beziehung zwischen der Mandelsäure und ihrem Nitril hatte bekanntlich auch Rosenthaler beobachtet.

C. Isolierung der optisch-aktiven Mandelsäuren nach ihrer asymmetrischen Synthese durch Katalysatoren.

Die Bereitung einer optisch-aktiven und reinen Mandelsäure selbst war als der allerbeste positive Nachweis bezeichnet

[1]) E. Rimbach, Zeitschr. f. physik. Chem. **28**, 254, 1899.

worden, daß unsere asymmetrische Synthese in der Tat gelungen ist. Zur Isolierung der Mandelsäure selbst war es zweckmäßig, die Hauptversuche der Tabelle I nunmehr in größerem Maßstabe zu wiederholen, und daher wurden in Tabelle II noch folgende 4 Versuche, 2 mit Chinin und 2 mit Chinidin, ausgeführt. Bei allen diesen Versuchen wurden die Mengen aller Komponenten und Reagenzien (einschließlich der Lösungsmittel) gerade verdoppelt, und daher sind die Konzentrationen in Tabelle II immer gleich denen der Versuche in Tabelle I und die Ablesungen bei gleichen Rohrlängen also direkt vergleichbar.

Tabelle II.

Hauptversuche	Drehung I		Drehung II		Drehung III	Drehung IV	Drehung V
	Chloroform-schicht	Wässerige Schicht	Chloroform-schicht	Wässerige Schicht			
5. Mit Chinin	+ 0,31°	− 2,25°	+ 0,38°	− 0,13°	− 0,92°	− 0,05°	− 0,74°
6. Mit Chinidin	− 0,24°	+ 2,59°	− 0,32°	+ 0,17°	+ 0,82°	0,00°	+ 0,64°
7. Mit Chinin	+ 0,36°	− 2,20°	+ 0,38°	− 0,12°	− 0,75°	− 0,01°	− 0,41°
8. Mit Chinidin	− 0,22°	+ 2,51°	− 0,28°	+ 0,20°	+ 0,64°	0,00°	+ 0,49°

Wie im vorigen Kapitel wurde auch der Molgehalt an optisch-aktiver Säure in den verschiedenen Lösungen berechnet und man erhält so Tabelle III.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Molgehalt an aktiver Säure ermittelt: aus der Drehung der Säurelösung	aus der Drehung der alkal. Lösung
3	0,0043	0,0042
4	0,0049	0,0050
5	0,0097	0,0103
6	0,0086	0,0089
7	0,0079	0,0057
8	0,0066	0,0068

Der verschiedene, aber zweifellose Gehalt der Lösungen an optisch-aktiver Säure ist wahrscheinlich auf kleine Unterschiede der Behandlung zurückzuführen. Auch ist zu erwähnen, daß in den letzten beiden Versuchen Soda anstatt Natronlauge und zum Ausschütteln der eventuell noch vorhandenen Alkaloidspuren aus der soda-alkalischen Mandelsäurelösung Chloroform anstatt Benzol benutzt wurde.

Zur Gewinnung der optisch-aktiven Säure selbst wurden nun die letzten beiden Versuche Nr. 7 und 8 nach folgendem Verfahren fortgesetzt: Die alkalische Lösung der Säure wurde, nachdem sie zur Entfernung eventueller Alkaloidspuren mit Chloroform ausgeschüttelt und auf „Drehung V" polarisiert worden war, mit Salzsäure angesäuert, etwas eingedampft und dann mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, bis die wässerige Schicht keine Drehung mehr zeigte. Dann wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand im Wasser gelöst und zur Entfernung des immer vorhandenen Öles mit Blutkohle [1]) gekocht und filtriert. Die Lösung wurde nun zunächst bis zum Auftreten von Krystallen eingedampft und abgekühlt. Dann wurden die abgeschiedenen Krystalle auf einem Saugfilter abfiltriert. Sie zeigten sich bei der Polarisation als praktisch inaktiv. Dieses Verfahren wurde noch zweimal wiederholt (in beiden Versuchen zeigte die letzte Krystallfraktion eine optische Aktivität, die einem Gehalte von etwa 1 bis 2 °/₀ optisch-aktiver Säure entsprach).

Endlich wurde die Mutterlauge bis zu einem Volumen von nur 5 bis 10 ccm eingedampft, die Krystalle wurden wie oben abfiltriert und durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt.

Die zwei so bereiteten Proben der Mandelsäure, in denen nochmals mit Brom und Ammoniak die Abwesenheit von Chinin bzw. Chinidin festgestellt wurde, zeigten folgende Konstanten:

	Links-Säure (Versuch 7)	Rechts-Säure (Versuch 8)
Schmelzpunkt	116,5°	116,5°
Spezifische Drehung $[\alpha]_D$ . . .	— 4,7°	+ 13,6°
Prozentgehalt an aktiver Säure	3,0 °/₀	8,7 °/₀
Prozentgehalt an Mandelsäure (Äquivalentbestimmung) . .	98,1 °/₀	99,6 °/₀

Die oben angegebenen Schmelzpunkte liegen etwas unterhalb des Schmelzpunktes der reinen racemischen Säure, wie zu erwarten war. J. Lewkowitsch [2]) hat nämlich gefunden,

[1]) Durch eine besondere Extraktion der Blutkohle mit inaktiver Mandelsäure haben wir uns zur Vorsicht in einem Nullversuch noch besonders überzeugt, daß von der Blutkohle keine optisch-aktiven Verunreinigungen abgegeben werden.

[2]) J. Lewkowitsch, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **16**, 1568, 1883.

daß der Schmelzpunkt der „optisch-reinen“ aktiven Säure bei 132,8° liegt. Dieser wird natürlich durch Zusatz von racemischer Säure erniedrigt, und ebenso wird der Schmelzpunkt der racemischen Säure (118°) durch Zusatz von aktiver auch erniedrigt, wie Lewkowitsch in der Tat zu konstatieren vermochte.

Die Äquivalentbestimmungen in der Tabelle wurden durch azidimetrische Titration mit Barytwasser (etwa $^1/_{40}$ normal), das seinerseits mit reiner Bernsteinsäure eingestellt war, und Phenolphthalein ausgeführt.

Von der Rechts-Säure wurde auch eine Elementaranalyse gemacht, die folgende Resultate gab:

				% C	% H
Gewicht	Substanz	0,1796 g	Ber.	63,14	5,30
„	CO_2	0,4155 g	Gef.	63,09	5,48
„	H_2O	0,0878 g			

Eine Frage soll hier noch erörtert werden: Warum konnten wir mit Alkaloid als Katalysator nur eine so kleine Ausbeute an optisch-aktiver Säure bekommen, während Rosenthaler bei derselben Reaktion, aber mit Emulsin als Katalysator eine Ausbeute von polarimetrisch reiner Mandelsäure erhalten konnte? — Erstens ist hierzu zu bemerken, daß wir die günstigsten Bedingungen unserer Synthese bis jetzt noch nicht genügend genau kennen, sondern daß sie erst durch genauere kinetische und statische Untersuchung der Reaktion festgelegt werden müssen. Hier kam es aber bis jetzt nur darauf an, qualitativ nachzuweisen, daß überhaupt ebenso wie durch Emulsin so auch durch Katalysatoren von bekannter Zusammensetzung optisch-aktive Mandelsäure erhalten werden kann. Zweitens ist zu erwähnen, daß das Verfahren, wodurch Rosenthaler seine polarimetrisch reine Säure erhalten hat, nicht einwandfrei beweisend dafür ist, daß durch die Emulsinwirkung nicht auch etwas inaktive Säure gleichzeitig entstanden ist. Er hat nämlich vor dem Polarisieren seine Probe von aktiver Säure „zweimal aus Benzol umkrystallisiert“. Nehmen wir an, daß er ursprünglich ein Gemisch von racemischer und optisch-aktiver Säure gehabt hat und daß das Mengenverhältnis der beiden ein solches war, daß sein Gemisch mehr optisch-aktive Säure ent-

hielt, als das „Zweibodenkörpersystem" nach Roozeboom[1]). Dann mußte er bekanntlich durch Umkrystallisieren, d. h. durch Konzentrieren (Erkaltenlassen kommt nahezu auf dasselbe heraus) der Lösung doch zuerst Krystalle von polarimetrisch reiner, aktiver Säure erhalten, trotz der Gegenwart auch von inaktiver Säure. Beim zweiten Umkrystallisieren war das dann um so sicherer, vorausgesetzt, wie oben erwähnt, daß in seinem ursprünglichen Gemisch der Gehalt an aktiver Säure bereits größer war, als der Zusammensetzung der Säure im „Zweibodenkörperpunkt" entspricht. Natürlich ist es möglich, daß er in der Tat nur polarimetrisch reine aktive Säure durch das Emulsin erhalten hat, aber durch sein Verfahren ist das bisher noch nicht einwandfrei bewiesen worden.

Bei unseren Versuchen mit Katalysatoren bekannter Zusammensetzung lagen offenbar die Bedingungen gerade umgekehrt, d. h. die Zusammensetzung unseres Mandelsäuregemisches lag offenbar zwischen den beiden „Zweibodenkörperpunkten" des Roozeboomschen Löslichkeitsdiagramms, d. h. sie war eine solche, daß die ersten Fraktionen der Krystalle immer inaktiv sein mußten und die optisch-aktive Säure (und zwar gemischt mit einer konstanten Menge inaktiver Säure) erst dann herauskommen konnte, als wir durch weiteres Eindampfen schließlich zum „Zweibodenkörperpunkte" gelangt waren.

Es wird daher nicht ohne Interesse sein, das Roozeboom-Diagramm für die Mandelsäure in allen geeigneten Lösungsmitteln und bei verschiedenen Temperaturen ausführlich experimentell zn bestimmen, um die günstigsten Krystallisationsbahnen für die Herstellung optisch-aktiver Säure aus ihren Gemischen mit inaktiver Säure wählen zu können.

D. Einwirkung von Cyanhydrinen auf Alkaloide.

Wie schon im Beginn des früheren Kapitels B erwähnt wurde, trat bei den ersten Versuchen zu unserer asymmetrischen Synthese eine unerwartete Schwierigkeit auf. Nach unserem Verfahren hatten wir zuerst beabsichtigt, das Alkaloid

[1]) Vgl. H. W. Bakhuis Roozeboom, Zeitschr. f. phys. Chem. **28**, 494, 1899, und A. Findlay, Phasenlehre (Bredigs Handb. d. angew. physikal. Chem. **6**, 1907, Leipzig), S. 177.

aus einer benzolischen bzw. toluolischen Lösung (die außerdem nur noch das Cyanhydrin und seine Komponenten, Blausäure und Benzaldehyd, enthielt) durch Ausschütteln mit einer wässerigen Salzsäurelösung zu entfernen. Aber schon bei den ersten Versuchen wurde gefunden, daß das Alkaloid, in diesem Falle das Chinin, durch dieses Verfahren nicht nur nicht vollständig entfernt werden konnte, sondern daß unter den gewählten Bedingungen praktisch überhaupt kein Chinin in die wässerige Salzsäureschicht übergeht.

Weil nun diese Tatsache vielleicht sowohl für die organische Chemie als auch für die gerichtliche Analyse von Interesse ist, und zweitens, weil sie anfänglich für unsere Untersuchungen ein großes Hindernis bildete, war es nicht nur der Mühe wert, sondern in der Tat sogar nötig, das Phänomen etwas weiter zu untersuchen:

Von den in der Dissertation (l. c) des einen von uns niedergelegten ausführlichen Daten seien hier nur folgende Versuche angeführt:

10 ccm (also 0,1 Mol) Benzaldehyd wurden mit 50 ccm einer Lösung von Blausäure in Benzol (die etwa 2-normal in bezug auf Blausäure war, also auch 0,1 Mol enthielt) gemischt und nach Zusatz von Chinin eine angegebene Zeitlang stehen gelassen. Dann wurde das Gemisch mit 10 ccm einer ca. 4-normalen wässerigen Salzsäurelösung 5 Minuten geschüttelt und beide Schichten wurden darauf polarisiert (Tab. IV):

Tabelle IV.

Chininmenge	Zeit des Stehens	Drehung der wässerigen Schicht im 2 dm-Rohr	Drehung der benzolischen Schicht im 2 dm-Rohr
0,2 g	1 Tag	0,00°	− 0,58°
0,3	5 Stunden	−0,01°	− 1,08°
0,5	16 „	−0,02°	− 1,78°
1,0	18 „	−0,17°	− 3,28°
2,0	3 „	−0,63°	− 6,34°
4,0	1,5 „	−2,58°	−10,30°

Es ist wahrscheinlich, daß in der benzolischen Schicht, wie wir jetzt wissen, etwas, und zwar eine unbekannte Menge, vom aktiven Cyanhydrin vorhanden war, das natürlich neben dem Alkaloid einen ebenfalls unbekannten Beitrag zu dem Drehungsvermögen der Lösung lieferte. Aber jedenfalls ist hier in Tabelle IV besonders deutlich aus der mangelnden oder nur sehr geringen Drehung der wässerigen Salzsäureschicht

nach dem Ausschütteln zu ersehen, daß das Chinin in einer Menge bis zu etwa 1 g bei Gegenwart von 0,1 Mol des Cyanhydrins bzw. seiner Komponenten vollständig gebunden im Benzol bleibt, und sogar noch von den zugesetzten 4,0 g Chinin der größte Teil. (Eine größere Menge von Alkaloid konnte man nicht gut anwenden, weil dann die Lösung zu alkalisch wurde und eine Verharzung eintrat.)

Daß das Chinin durch Einwirkung einer der Komponenten des Cyanhydrins allein nicht gebunden wird, zeigen folgende Versuche:

Tabelle V.

Chininmenge	Blausäure	Benzaldehyd	Drehung der wässerigen Schicht im 2 dm-Rohr	Drehung[1]) der benzolischen Schicht im 2 dm-Rohr
1,0 g	0,1 Mol	—	−22,14°	+0,02°
1,0	—	0,1 Mol	−21,52°	+0,01°
0,25	—	—	− 5,80°	+0,01°

In einer weiteren Versuchsserie konnte gezeigt werden, daß man ein Gemisch, bestehend aus 0,1 Mol Benzaldehyd, 0,1 Mol Blausäure und 2 g Chinin in 60 ccm benzolischer Lösung mit je 10 ccm wässeriger Salzsäure mehr als 70mal ausschütteln mußte, bevor alles Chinin aus der Benzolphase entfernt war.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß Chinin zwar nicht durch Blausäure oder Benzaldehyd allein, wohl aber durch ein Gemisch beider bzw. durch das Mandelsäurenitril in nichtwässeriger Lösung so stark gebunden wird, daß es selbst durch Salzsäure beim Ausschütteln nicht entfernt werden kann[2]). Bei den früheren Versuchen stand das Gemisch vor der Extraktion mit Salzsäure immer so lange, daß bereits eine erhebliche Menge des Cyanhydrins sich hatte bilden können. Folgende Versuche zeigen, daß dieses Warten vor der Extraktion für das neue Bindungsphänomen in der Tat nötig war, d. h. wenn Blausäure, Benzaldehyd und Alkaloid in Benzol zusammen gemischt und dann sofort mit Salzsäure

[1]) Der Messungsfehler beträgt bei allen unseren Versuchen 0,02° bis 0,03°.

[2]) Es scheint sogar nicht ausgeschlossen, daß die Salzsäure vielleicht bei dieser Bindung des Alkaloides durch das Cyanhydrin mithilft.

behandelt wurden, konnte das Alkaloid ohne Mühe mit verdünnter wässeriger Salzsäure wieder aus der Benzolschicht extrahiert werden:

Es wurden 0,1 Mol Benzaldehyd, etwa 0,1 Mol Blausäure in benzolischer Lösung und 0,3 g Chinin zusammengemischt und auf 60 ccm mit Benzol ergänzt. Beim Versuch (1) der Tabelle VI wurde ein solches Gemisch sofort mit 10 ccm der 4-normalen wässerigen Salzsäure ausgeschüttelt und dann nach 15 Stunden das Ausschütteln wiederholt. In einem Parallelversuch (2) Tabelle VI dagegen wurde das Gemisch erst nach 15 Stunden mit Salzsäure wie oben behandelt:

Tabelle VI.

Versuch	Drehung der wässerigen Salzsäureschicht (2 dm)	
	nach sofortigem Ausschütteln	nach Ausschütteln nach 15 Stunden
(1)	$-5,32^{\circ}$	$-1,51^{\circ}$
(2)	—	$-0,04^{\circ}$

Nach den vorhergehenden Versuchen kann es kaum bezweifelt werden, daß irgendeine Verbindung zwischen dem Alkaloid und dem Cyanhydrin entsteht. Daher vermuteten wir, daß das Alkaloid auch sogar umgekehrt aus einer salzsauren (!) wässerigen Schicht durch Ausschütteln mit toluolischer Cyanhydrinlösung extrahiert werden könne. Daß dies in der Tat der Fall ist, wird aus folgenden Versuchen klar sein:

Es wurden zwei Lösungen, die eine von Chinin, die andere von Chinidin in 4-normaler wässeriger Salzsäure hergestellt von solcher Stärke, daß gerade 0,1 g des Alkaloids in 20 ccm der Lösung enthalten war. Dann wurden je 20 ccm dieser Lösungen mit je 50 ccm einer toluolischen Lösung von 0,1 Mol Benzaldehydcyanhydrin 5 Minuten kräftig geschüttelt, und darauf wurden beide Schichten im 2 dm-Rohre polarisiert:

Tabelle VII.

Alkaloid	Drehung der toluolischen Schicht	Drehung der wässerigen Schicht
Chinin	$-0,47^{\circ}$	$-0,02^{\circ}$
Chinidin	$+0,67^{\circ}$	$+0,01^{\circ}$

Man sieht also, daß das Alkaloid aus der wässerigen salzsauren Lösung verschwunden und in die toluolische Cyanhydrinlösung übergegangen ist.

Es wurde auch untersucht, ob dieses auffallende Phänomen der Bindung zwischen Cyanhydrin und Alkaloid, das vermutlich auch bei der asymmetrischen Synthese eine gewisse Rolle als katalytische Zwischenreaktion spielt und noch weiter untersucht werden soll, bei Schwefelsäure ebenso wie bei Salzsäure auftritt. In der Tat wurde in diesem Falle qualitativ das gleiche Resultat mit Schwefelsäure wie mit Salzsäure beobachtet, aber quantitativ in weit geringerem Maße. Mit Schwefelsäure kann man im Gegenteil das Alkaloid, falls es nur in geringen Konzentrationen vorhanden ist, durch zweimaliges Ausschütteln ziemlich gut entfernen und erst bei höheren Konzentrationen bleibt es in der nichtwässerigen Schicht fester gebunden.

Das Verhalten der verschiedenen Alkaloide scheint nach einigen hier nicht wiedergegebenen Versuchen etwas verschieden zu sein. Codein scheint vom Cyanhydrin nicht so fest gebunden zu werden wie Chinin und Chinidin, während Brucin fester und Cocain noch fester gebunden erscheinen.

Die Ursache des ganzen Phänomens ist, wie gesagt, höchstwahrscheinlich in der Entstehung einer Verbindung zwischen Alkaloid und Cyanhydrin zu finden. Was für einen Einfluß die Säure auf die Entstehung bzw. Zersetzung derselben hat, ist bis jetzt unbekannt, ebenso die Ursache des Unterschiedes im Verhalten von Salzsäure und Schwefelsäure. Über diesen Punkt sollen weitere Versuche mit den Methoden der organischen Chemie entscheiden. Wir haben bereits festgestellt, daß nur Cyanhydrine, wie Benzaldehydcyanhydrin, Valeraldehydcyanhydrin und Zimtaldehydcyanhydrin, diese Erscheinung zeigen. Jedoch scheint weder die Cyangruppe, noch die Hydroxylgruppe allein die Ursache der Alkaloidbindung zu sein, da nach unseren Versuchen beim Ersatz des Cyanhydrins durch Stoffe wie Benzonitril, Benzylcyanid oder sekundären Phenyläthylalkohol die Bindung des Alkaloids nicht eintritt. Daß Cyanhydrine mit Basen mannigfache Reaktionen eingehen können, ist in der Literatur bekannt.

E. Zusammenfassung.

1. Es wurde gefunden, daß bei Anwendung eines optisch-aktiven Alkaloides als Katalysator die Bildung von Benzaldehydcyanhydrin aus seinen Komponenten

Blausäure und Benzaldehyd optisch-asymmetrisch verläuft, d. h. daß eine „asymmetrische Synthese“ durch einen Katalysator bekannter Zusammensetzung gerade so ausgeführt werden kann, wie durch ein Enzym. In diesem Falle wurde das Enzym Emulsin ersetzt durch die Katalysatoren Chinin und Chinidin.

2. Es wurde unter Benutzung von Chinin als Katalysator neben inaktivem Cyanhydrin durch asymmetrische Synthese rechtsdrehendes Cyanhydrin gebildet, aus welchem durch Verseifung eine linksdrehende Mandelsäure erhalten werden konnte. Unter Benutzung des (mit Chinin isomeren, aber im Drehungsvermögen entgegengesetzten) Chinidins als Katalysator wurde dagegen neben inaktivem Cyanhydrin linksdrehendes Cyanhydrin gebildet, aus welchem durch Verseifung eine rechtsdrehende Mandelsäure erhalten werden konnte. Durch geeignete Wahl des optisch-aktiven Katalysators bekannter Zusammensetzung können wir also nach Belieben die Wirkung eines l-Enzymes oder eines d-Enzymes nachahmen.

3. Da die Menge der erhaltenen optisch-aktiven Mandelsäure in Äquivalenten bzw. Molen größer ist als die Menge des als Katalysator angewandten Alkaloides, so ist der Charakter der Reaktion als Katalyse gesichert.

4. Es wurde beobachtet, daß die Cyanhydrine eine auffallend starke Verwandtschaft zu Alkaloiden, wie Chinin, Chinidin usw., besitzen, so daß letztere unter gewissen Umständen nichtwässerigen Cyanhydrinlösungen nur sehr schwer durch Ausschütteln mit wässeriger Salzsäure entzogen werden können, und daß sogar umgekehrt eine nichtwässerige Benzaldehydcyanhydrinlösung einer wässerigen Salzsäurelösung das Alkaloid beim Ausschütteln vollständig entziehen kann.

Untersuchungen über freie und gebundene Salzsäure im Mageninhalt.

I. Mitteilung.

Bestimmung freier Salzsäure im Mageninhalt.

Von

Johanne Christiansen.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Menge freier Salzsäure im Mageninhalt wird gewöhnlich durch Titrierung mit $^{n}/_{10}$-NaOH bestimmt, indem man als Indicatoren Kongo, Methylorange, Dimethyl-amido-azobenzol, Tropäolin oder Günzburgs Reagenz benutzt. Es herrscht indes keineswegs Einigkeit darüber, welcher von diesen Indicatoren vorzuziehen ist, noch weniger über die eigentliche Bedeutung der Differenz zwischen deren Titrierungszahlen, und fortgesetzte Untersuchungen über diese Fragen sind deshalb von großem Interesse.

Diese Aufgabe hat zahlreiche Forscher beschäftigt, und es wird daher nötig sein, zuerst eine kurze Darstellung zu geben, um die verschiedenen Phasen, die das Problem der freien Salzsäure durchlaufen hat, zu beleuchten, und die gegenwärtige Stellung der Frage klar zu machen.

Reoch[1]) war der erste, der (1874) eine Farbenreaktion zum qualitativen Nachweis der freien Salzsäure erfand, nämlich Citras ferricochinic. und Rhodankalium, das mit freier Salzsäure eine rote Farbe gibt, und dieses Reagenz wurde schon 1877 von Szabo[2]) zur Ausbildung einer quantitativen Methode benutzt.

---

[1]) J. Reoch, Journ. of Anat. and Physiol. 1874.

[2]) Szabo, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 140, 1877.

Reochs und Szabos Methode war indes recht beschwerlich und ungenau; es bedeutete deshalb einen Fortschritt, als Köster[1]) 1885 die Titrierung mit Natron, die bisher nur zur Bestimmung der Gesamt-Acidität benutzt worden war, auch zur Bestimmung der Menge freier Salzsäure vorschlug. Als Indicator benutzte er Methylviolett; der Umschlag dieses Indicators war aber recht schwierig zu erkennen, und man versuchte ihn deshalb bald durch andere Stoffe zu ersetzen. So schlägt Mintz[2]) 1889 das von Günzburg[3]) zur qualitativen Untersuchung vorgeschlagene Phlorogluein-Vanillin vor, Mörner[4]) das Kongopapier und Töpfer[5]) das Dimethyl-amido-azo-benzol; weiter kann man nennen: Tropäolin, Fuchsin, Benzopurpurin, Brillantgrün, Smaragdgrün, Malachitgrün, Ultramarin, Zinksulfid und viele andere.

Gemeinsam war allen diesen Methoden die Titrierung mit $^{n}/_{10}$-NaOH. Der Streit drehte sich nur darum, welche von diesen Indicatoren die richtigen Resultate gaben, und da sichere Methoden zur Entscheidung dieser Frage nicht vorhanden waren, begnügte man sich zuletzt mit den Indicatoren, die den besten Umschlag lieferten, also namentlich Kongo für die freie und Phenolphthalein für die Gesamtsalzsäure.

In den letzten Jahren ist indes auch die Berechtigung der Titrierung in Frage gestellt worden, indem als eine Folge der Arrheniusschen Dissoziationstheorie eine starke Skepsis sich der Möglichkeit gegenüber erhob, überhaupt Titrierungen zur Bestimmung der wahren Acidität benutzen zu können. Während man früher gemeint hatte, daß in Lösungen recht stabile Verhältnisse herrschten, so daß man die gegenwärtige freie Salzsäure genau bestimmen könnte, wenn man nur den rechten Indicator benutzte, so lernte man nun, daß die sauern Eigenschaften der Lösungen von der Konzentration der freien Wasserstoffionen abhingen, und diese Wasserstoffionenkonzentration könnte man nicht einfach durch eine Titrierung bestimmen. Durch den Zusatz von Natron wird nämlich das Gleichgewicht der Lösung derart gestört, daß die an Peptone oder Salze gebundene Salzsäure nach und nach freigemacht wird. Die Titrierung wird also zu hohe Zahlen geben, weil

---

[1]) H. Köster, Upsala Läkareföreningens förhandl. **20**, 355, 1885.
[2]) S. Mintz, Wiener klin. Wochenschr. **1889**, S. 400.
[3]) A. Günzburg, Centralbl. f. klin. Med. **1887**, S. 737.
[4]) C. Th. Mörner, Upsala Läkareförenings förhandl. **24**, 483, 1889.
[5]) G. Töpfer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 104, 1894.

nicht bloß die freie Säure, sondern auch die von dem Alkali freigemachte Säure mit zur Bestimmung kommt.

Dieser Gesichtspunkt ist jüngst namentlich von S. P. L. Sörensen hervorgehoben worden und wird von ihm folgendermaßen ausgedrückt (Enzymstudien II, S. 140): „Es ist einleuchtend, daß eine Methode, bei der die Konzentration der Wasserstoffionen während der Messung abgeändert wird, — und das gilt ja von der ganzen Gruppe von Methoden, die auf titrimetrischen Bestimmungen der Acidität oder der Alkalinität basiert sind — für die Bestimmung dieser Konzentration unbrauchbar ist.“

Mit spezieller Rücksicht auf die vorliegende Frage ist die Sache von fünf Forschern untersucht worden, nämlich von C. Foa[1]), Fr. Tangl[2]), P. Fraenkel[3]), L. Michaelis und H. Davidsohn[4]). Von diesen haben die drei ersten reinen Magensaft untersucht, die beiden letzteren Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück. Alle diese Verfasser haben die elektrometrische Methode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration benutzt und eine titrimetrische Methode, nämlich Titrierung mit Kongo oder Methylorange als Indicatoren damit verglichen.

Die Resultate ihrer Versuche zeigen charakteristische Unterschiede, indem die Verfasser, die mit reinem Magensaft gearbeitet haben, ganz gute Übereinstimmung mit den Kongo-Zahlen finden, während Michaelis und Davidsohn im Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück recht große Verschiedenheiten zwischen den Wasserstoffionenkonzentrationen und den Titrierungszahlen mit Methylorange konstatieren, trotzdem Methylorange etwa denselben Umschlagspunkt wie Kongorot besitzt.

Wegen der Verschiedenheiten der bisherigen Resultate hat Prof. K. Faber mich veranlaßt, diese Frage wieder aufzunehmen, um mehrere Indicatoren zu untersuchen und speziell das auf der hiesigen Klinik viel verwendete Kongopapier einer genaueren Prüfung zu unterwerfen.

Michaelis und Davidsohn meinen aus ihren Versuchen die Schlußfolgerung ziehen zu können, daß man zur Aciditätsbestimmung im Mageninhalt die Titrierungsmethoden nicht verwenden kann; dieses ist, wie schon erwähnt, unbestreitbar, wenn man unter Acidität die Wasserstoffionenkonzentra-

---

[1]) C. Foa, Compt. rend. de la Société de Biol. 1, 865, 1905.

[2]) Fr. Tangl, Arch. f. d. ges. Physiol. 115, 64, 1906.

[3]) P. Fraenkel, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1.

[4]) L. Michaelis u. H. Davidsohn, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 8, 398, 1911.

tion versteht. Dagegen soll es in dem Folgenden klar gemacht werden, daß man zur Bestimmung freier Salzsäure im Mageninhalt eine vorzügliche Methode besitzt, und daß diese Methode auch in bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration ganz gute Resultate gibt, weil ja die freie Salzsäure die wichtigste Quelle der Wasserstoffionen im Mageninhalte ist.

Wie schon erwähnt, sind die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration und die Bestimmung der freien Säure zwei ganz verschiedene Dinge; nur im speziellen Fall, wo wir es mit starken Säuren zu tun haben, deren Dissoziation von freien Wasserstoffionen so bedeutend ist, daß sie das wesentlichste Kontingent zur Gesamt-Wasserstoffionenkonzentration liefern, kann man die beiden Methoden vergleichen, und also die elektrometrische Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration als Kontrolle für die Titrierungsmethoden zur Bestimmung der freien Säure benutzen.

Dieses ist gerade dann der Fall, wenn wir es mit salzsaurem Mageninhalt zu tun haben, und es wird also hier möglich sein, bei den erwähnten vergleichenden Untersuchungen Aufklärung zu bekommen, ob vielleicht einer von den zahlreichen Indicatoren bei der Titrierung Zahlen gibt, die als Ausdruck der Menge freier Salzsäure betrachtet werden können.

Bevor diese Versuche erwähnt werden, sollen erstens die elektrometrische Methode und zweitens die Titrierungsmethoden besprochen werden.

A. Die elektrometrische Methode.

Die theoretische Grundlage der elektrometrischen Methode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration ist von Nernst gegeben, und die Methode wurde anfänglich nur in rein physikalisch-chemischen Arbeiten benutzt.

1898 wurde die Methode von Bugarszky und Liebermann[1]) in die physiologische Chemie eingeführt und ist seitdem von zahlreichen Forschern auf biologischem Gebiete benutzt und teilweise auch modifiziert worden. In den letzten Jahren hat namentlich S. P. L. Sörensen[2]) die Methode in vervollkommneter Form verwandt und an mehreren Stellen ausführlich beschrieben. Da die in dieser Arbeit benutzte Technik

---

[1]) St. Bugarszky u. Leo Liebermann, Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 51, 1898.

[2]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

mit der seinigen recht genau übereinstimmt und teilweise unter seiner Leitung ausgeführt wurde, wird es überflüssig sein, eine weitläufige Darstellung davon zu geben.

Es sollen nur einige Hauptpunkte hier erwähnt werden. Das Prinzip der Methode ist bekanntlich das folgende: Wenn man eine mit Platinmoor bedeckte Platinplatte in eine wässerige Lösung eintaucht und die Lösung sowie auch die Platte mit Wasserstoff sättigt, so entsteht zwischen der Platinplatte und der Lösung eine Potentialdifferenz, deren Größe gesetzmäßig von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängt. Durch Messung dieser Potentialdifferenz ist es daher möglich, die Wasserstoffionenkonzentration zu ermitteln.

Die Sättigung der Platinelektrode mit Wasserstoff kann man auf zweierlei Weisen erreichen, entweder durch die Methode der strömenden Wasserstoffatmosphäre, die nach S. P. L. Sörensen[1]) als Standardmethode angesehen werden muß, oder durch die Hasselbalchsche Schaukelmethode[2]), die bei kohlensäurehaltigen Lösungen zu verwenden ist, indem hierdurch die Verdrängung der Kohlensäure durch den Wasserstoffstrom vermieden wird.

In den hier zu erwähnenden Versuchen ist die erste Methode gewählt worden, da die geringe Menge von Kohlensäure im salzsauren Mageninhalt ganz ohne Bedeutung für die Wasserstoffionenkonzentration ist.

Zur Entwicklung von Wasserstoff wurde ein gewöhnlicher Kippscher Gasentwicklungsapparat mit Zink und 10% Schwefelsäure benutzt. Es dauerte im allgemeinen mehrere Stunden, bevor vollständige Sättigung der Lösung und der Platin-Wasserstoffelektrode erreicht worden war. Während dieser Zeit befand sich die elektromotorische Kraft in beständigem Zunehmen, und erst wenn mehrere Messungen mit Zwischenraum von 10 bis 15 Minuten dasselbe Resultat gaben, konnte man dieses als endgültig ansehen.

Zur Messung der gesuchten Potentialdifferenz zwischen der mit Wasserstoff beladenen Platinplatte und der Lösung wird diese Gaselektrode als die eine Hälfte eines Elements verwendet; als die andere Hälfte dient eine Quecksilberkalomelelektrode, deren Potentialdifferenz konstant und bekannt ist.

Die Aufgabe besteht nun darin, die elektromotorische Kraft dieses kleinen Elements zu messen, und dieses geschieht einfach durch die Kompensationsmethode Poggendorffs mit einem Lippmannschen Capillarelektrometer als „Nullinstrument".

Hat man hierdurch die Größe der elektromotorischen Kraft, in Millivolt ausgedrückt, gefunden, dann ist es leicht, bei Benutzung der „Exponentiallinie" nach S. P. L. Sörensen[3]) die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung zu finden.

---

[1]) S. P. L. Sörensen, Ergebnisse d. Physiol. **12**, 393.

[2]) K. A. Hasselbalch, diese Zeitschr. **30**, 317, 1910.

[3]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. **21**, 131, 1909.

In Fig. 1 ist die Exponentiallinie als Funktion von Millivolt (Ordinate) und „Wasserstoffionenexponent“ (Abszisse) dargestellt.

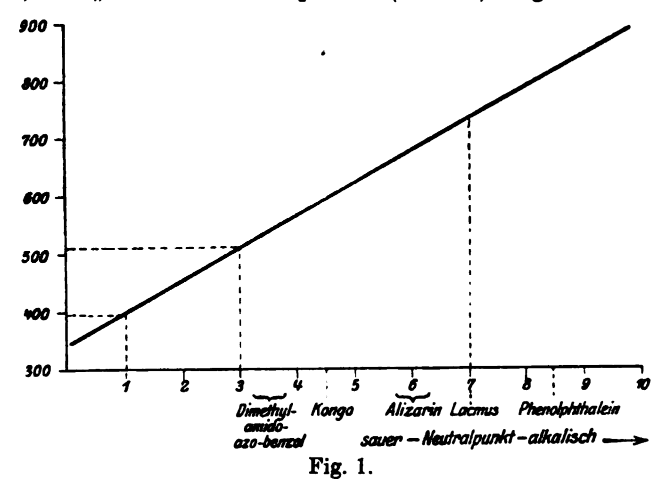


Fig. 1.

Der Wasserstoffionenexponent wird von S. P. L. Sörensen als der numerische Wert des Exponenten der Potenz von 10, wodurch die Wasserstoffionenkonzentration ausgedrückt werden kann, definiert. Ist z. B. die Wasserstoffionenkonzentration, C_H, einer Lösung $^n/_{1000} = 10^{-3}$, dann ist der Wasserstoffionenexponent $p_H = 3$; die dazugehörige elektromotorische Kraft ist, wie aus der Figur ersichtlich, 510 Millivolt.

Die Benutzung des derart definierten Wasserstoffionenexponenten als Maß für die Größe der Wasserstoffionenkonzentration ist von S. P. L. Sörensen aus Zweckmäßigkeitsgründen vorgeschlagen; dieses Verfahren ermöglicht nämlich die einfache graphische Darstellung, z. B. von der Abhängigkeit zwischen elektromotorischer Kraft und Wasserstoffionenkonzentration (siehe Figur 1, die den „Enzymstudien II“ entnommen ist).

Das Verhältnis zwischen diesen beiden Faktoren ist also ein logarithmisches; je größer die elektromotorische Kraft, desto größer der Wasserstoffionenexponent, und desto kleiner die Wasserstoffionenkonzentration.

Die in der Klinik verwendeten Titrierungszahlen bedeuten die Anzahl von $^1/_{10}$ ccm $^n/_{10}$-NaOH, die zu 10 ccm vom Mageninhalt gesetzt werden müssen, um mit dem Indicator Umschlag zu geben, und sie sind daher, die Zuverlässigkeit der Titrierungszahlen des betreffenden Indicators als Ausdruck der freien Salzsäure vorausgesetzt, der Konzentration freier Salzsäure, mit 1000 multipliziert, gleich zu setzen.

Die Konzentration $^n/_{10}$-HCl ($p_H = 1$) hat z. B. die Titrierungszahl 100, während die Konzentration $^n/_{1000}$-HCl ($p_H = 3$) die Titrierungszahl 1 ergibt. Weil nun die bei Ewalds Probefrühstück erreichten Titrierungszahlen sich gewöhnlich zwischen 1 und 100 befinden, wird das Stück

auf der Abszisse, das zwischen 3 und 1 liegt, das Gebiet sein, innerhalb dessen die hier zu unternehmenden Messungen gelegen sein werden. Die entsprechenden elektromotorischen Kräfte liegen daher, wie die Figur zeigt, zwischen 396 und 510 Millivolt.

Es ist außerdem aus der Figur ersichtlich, daß saure Lösungen überhaupt die Wasserstoffionenexponenten 0 bis 7 haben, wovon also nur das Stückchen von 1 bis 3 den Titrierungszahlen 100 bis 1 ent-entsprechen. Das große Stück von 3 bis zum Neutralpunkt 7 entspricht den niedrigen Aciditäten zwischen der Titrierungszahl 1 und dem Neutralpunkt, der die Titrierungszahl 0 ergibt, und eben auf diesem Gebiet haben die meisten Indicatoren ihre Umschlagspunkte. Zwischen den Wasserstoffionenexponenten 3 und 7 ist es also möglich, die Wasserstoffionenkonzentration durch die elektrometrische Methode mit außerordentlich großer absoluter Genauigkeit festzustellen.

Alkalische Lösungen haben Wasserstoffionenexponenten, die höher als 7 sind, und der Neutralpunkt selbst liegt etwa am Wasserstoffionenexponenten 7 (genau 7,07).

Die Neutralität einer Lösung bedeutet nicht, daß ihr Wasserstoffionen fehlen, sondern nur, daß sie ebenso viele Wasserstoffionen wie Hydroxylionen enthält, wogegen eine saure Lösung mehr Wasserstoffionen als Hydroxylionen, und eine alkalische Lösung mehr Hydroxylionen als Wasserstoffionen enthält. In einer alkalischen Lösung finden sich somit auch freie Wasserstoffionen, und da diese im Gegensatz zu den Hydroxylionen für direkte Messung zugänglich sind, ist es praktisch, auch hier mit der Wasserstoffionenkonzentration zu rechnen. Wenn man diese kennt, ist es leicht, die Hydroxylionenkonzentration zu berechnen, denn das Produkt dieser Faktoren ist, dem Massenwirkungsgesetz gemäß, für jede gegebene Temperatur konstant. Bei 18° ist es $C_H \cdot C_{OH} = 10^{-14,14}$, wo C_H die Wasserstoffionenkonzentration, und C_{OH} die Hydroxylionenkonzentration bezeichnet.

Es werden übrigens im folgenden nur saure Lösungen besprochen, und wir werden daher auf das Verhältnis derselben näher eingehen.

B. Die Titrierungsmethoden.

Die Titrierungen werden in der Klinik gewöhnlich folgendermaßen unternommen: Zu 10 ccm vom Mageninhalt wird aus einer Bürette $^n/_{10}$-NaOH zugesetzt, bis der Indicator seine Farbe wechselt, und die Titrierungszahl, die sich dadurch ergibt, ist hier verschieden für die verschiedenen Indicatoren. Es ist bekannt, daß man bei Titrierung reiner Salzsäurelösungen mit jedem Indicator etwa dieselben Titrierungszahlen bekommt, wogegen z. B. Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück Titrierungszahlen aufweist, die vom gewählten Indicator in hohem Grade abhängig sind. Die Differenz zwischen den Titrierungszahlen dieser Indicatoren variiert mit der Menge von Albumosen und Peptonen im Mageninhalt. Bei reinem Magensaft ist der Abstand kleiner wie nach Ewalds Probefrühstück; nach der fleischreichen Bourgets Probemahlzeit ist er dagegen viel größer.

Die folgenden Titrierungen mit Günzburgs Reagens, Kongopapier und Phenolphthalein als Indicatoren sollen diese drei Typen schematisch darstellen:

	Günzburgs Reagens	Kongopapier	Phenolphthalein
Reiner Magensaft . .	25	30	35
Ewalds Probefrühstück	25	45	65
Bourgets Probemahlzeit	25	75	125

Titriert man zur Vergleichuug eine reine $^{n}/_{40}$-Salzsäurelösung, so wird man mit allen drei Indicatoren etwa dieselbe Zahl bekommen, nämlich ca. 25, dieselbe also wie die Günzburg-Zahl in den drei obenstehenden Typen.

Es sind, wie erwähnt, hauptsächlich die Albumosen und Peptone die Ursache, daß Mageninhalt sich nicht wie reine Salzsäurelösungen, den Indicatoren gegenüber, verhält. Die Proteine sind nämlich imstande, Salzsäure derart zu binden, daß sie wieder bei Zusatz von Natron abgespalten wird. Macht man z. B. eine Lösung von Pepton im Überschuß von Salzsäure, dann hat man also in der Lösung teils freie Salzsäure und teils ein sauer reagierendes Salz von Pepton und Salzsäure, nämlich das Peptonhydrochlorid. Die Titrierung einer solchen Lösung bis zur Lackmus-Neutralität geschieht — schematisch genommen — in zwei Abschnitten. Der erste Abschnitt ist die Sättigung der freien Salzsäure, und wenn nichts anderes in der Lösung war, würde die Titrierung damit abgeschlossen und der Neutralpunkt erreicht sein; indes ist im vorliegenden Fall auch das saure Salz zugegen, und dieses besitzt eine eigene Wasserstoffionenkonzentration, die derjenigen einer $^{n}/_{1000}$-Salzsäure (Titrierungszahl 1) naheliegt, und deren Wasserstoffionenexponent somit etwa 3 ist. Der zweite Abschnitt der Titrierung besteht nun darin, daß Salzsäure vom Peptonhydrochlorid abgespalten wird und mit dem zugesetzten Natriumhydroxyd Natriumchlorid bildet; da aber diese Salzsäure nicht frei war, bewirkt der fortgesetzte Zusatz von Natriumhydroxyd nur eine verhältnismäßig geringe Änderung der Acidität, trotzdem zur vollständigen Abspaltung der Säure oft bedeutende Mengen von Alkali verbraucht werden. Hierdurch wird es erklärt, daß das Gebiet vom Wasserstoffionenexponenten 3 bis zum Neutralpunkt 7 in solchen Fällen während der Titrierung sehr langsam durchlaufen wird, und daß daher die verschiedenen Indicatoren in proteinhaltigen Lösungen verschiedene Titrierungs-

zahlen geben, während bei reiner Salzsäure, wie eine einfache Berechnung zeigt, ein paar Tropfen $^{n}/_{10}$-NaOH genügen, um den Wasserstoffionenexponenten von 3 auf 7 zu bringen, so daß also ungefähr gleichzeitig bei allen Indicatoren, die auf diesem Gebiete brauchbar sind, ein Umschlag erfolgt.

Wie Peptone verhalten sich auch andere Stoffe (Glycin, Citrate, Phosphate usw.), die von S. P. L. Sörensen den Sammelnamen „Puffer" erhalten haben, und die man verwenden muß, wenn man bestimmte Wasserstoffionenkonzentrationen in der Nähe des Neutralpunktes hervorzubringen wünscht. Mittels Säuren und Alkalien allein ist es nämlich nicht möglich, ganz geringe und doch festliegende Wasserstoffionenkonzentrationen herzustellen, weil zufällige Verunreinigungen, z. B. die Alkalien des Glases, große Verschiebungen veranlassen können, wenn „Puffer" nicht zugegen sind.

Es wurde erwähnt, daß die meisten der Indicatoren ihre Umschlagspunkte zwischen den Wasserstoffionenexponenten 3 und 7 haben. Diese Umschlagspunkte, oder genauer Umschlagszonen, sind in bezug auf die meisten Indicatoren von S. P. L. Sörensen sehr genau bestimmt worden; nur zwei von den im folgenden verwendeten Indicatoren sind noch nicht untersucht worden, nämlich das Kongopapier und das Phloroglucinvanillin (Günzburgs Reagens).

Die folgende Zusammenstellung ist den „Enzymstudien II" (S. P. L. Sörensen[1]) entnommen und betrifft einige Indicatoren, die in der Klinik Verwendung gefunden haben.

	Wasserstoffionen-exponent p_H
Tropäolin 00	1,4 bis 2,6
Methylviolett	0,1 „ 3,2
Dimethyl-amido-azo-benzol	2,9 „ 4,0
Methylorange	3,1 „ 4,4
Kongorot	3 „ 5
Alizarin	5,5 „ 6,8
Lackmuspapier	7
Neutralrot	6,8 „ 8,0
Rosolsäure	6,9 „ 8,0
Phenolphthalein	8,3 „ 10,0

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

Diese Indicatoren sind in der Reihenfolge von der sauren zur basischen Seite geordnet. Der Umschlagspunkt des Tropäolins liegt somit bei einer hohen Wasserstoffionenkonzentration auf der sauren Seite, derjenige des Lackmuspapiers am Neutralpunkt, und derjenige des Phenolphthaleins auf der basischen Seite bei einer sehr geringen Wasserstoffionenkonzentration.

Wie man sieht, ist das Kongorot untersucht und hat seine Umschlagszone zwischen den Wasserstoffionenexponenten 3 und 5; Kongo verhält sich indessen in Lösung ganz anders als in Papierform, ein Verhalten, das später näher zu erörtern sein wird.

Der Umstand, daß ein Indicator eine Umschlagszone hat, innerhalb welcher seine Farbe allmählich sich ändert, hat große Bedeutung für die von S. P. L. Sörensen[1]) ausgebildete colorimetrische Methode, in bezug auf die Titrierung muß man aber verlangen, daß der Umschlag in einem schärfer bestimmten Punkt sich zeigt und nicht in einer größeren oder kleineren Zone. Es war daher in erster Reihe notwendig zu untersuchen, welche Indicatoren zu Titrierungsindicatoren überhaupt brauchbar wären, da ein Indicator zu colorimetrischen Messungen sehr verwendbar sein kann und doch, des schlechten Umschlags wegen, ganz unbrauchbar zur Titrierung.

Das folgende Beispiel soll den Unterschied zwischen brauchbaren und nicht brauchbaren Titrierungsindicatoren illustrieren, indem nur die Umschlagspunkte der ersteren mit bestimmten Zahlen angegeben werden können. Ein Filtrat vom Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück wird mit $^{n}/_{10}$-NaOH und 12 verschiedenen Indicatoren titriert, wobei die folgenden Titrierungszahlen erreicht werden.

Tropäolin	12	bis	19
Methylviolett	15	„	25
Mauvein	15	„	25
Günzburgs Reagens	25		
Boas' Reagens	25		
Dimethyl-amido-azo-benzol	36	„	38
Methylorange	41	„	43
Kongopapier	43		
Alizarin	49	„	51
Rosolsäure	51	„	53
Lackmuspapier	56		
Phenolphthalein	65		

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

Von diesen Indicatoren geben nur Günzburgs Reagens, Boas Reagens, Kongopapier, Lackmuspapier und Phenolphthalein einen guten Umschlag; Dimethyl-amido-azo-benzol, Methylorange, Alizarin und Rosolsäure geben einen einigermaßen guten Umschlag, während die drei ersten, Tropäolin, Methylviolett und Mauvein einen ganz unbrauchbaren Umschlag liefern. Auch Tropäolinpapier gibt einen sehr schlechten Umschlag, gleichwie Methylviolettpapier und Mauveinpapier. Von anderen Indicatoren sind versucht Fuchsin, Brilliantgrün und Benzopurpurin, die alle einen sehr undeutlichen Umschlag geben.

Es war hiermit gegeben, welche Indicatoren man zu den folgenden Versuchen erwählen mußte, nämlich erstens Phloroglucinvanillin (Günzburgs Reagens), Resorcinzucker (Boas' [1]) Reagens), Kongopapier, Lackmuspapier und Phenolphthalein. Die beiden letzteren sind nie als Indicatoren freier Salzsäure vorgeschlagen worden und wurden nur, um gleichzeitig die Totalacidität zu bestimmen, in die Versuche miteingezogen. Von den vier Indicatoren, die einen einigermaßen guten Umschlag gaben, hat man nur Methylorange und Dimethyl-amido-azo-benzol zur Bestimmung freier Salzsäure benutzt; von diesen wurde nur Dimethyl-amido-azo-benzol erwählt, da Methylorange von Michaelis und Davidsohn [2]) hinlänglich untersucht und unbrauchbar gefunden wurde, und weil es außerdem ungefähr denselben Umschlag wie das Kongopapier hat.

Endlich mußten Tropäolin, Methylviolett und Mauvein als Titrierungsindicatoren vollständig kassiert werden. Einige Versuche, sie zur colorimetrischen Methode nach S. P. L. Sörensen oder A. Müller [3]) zu verwenden, sind in einer früheren Abhandlung veröffentlicht worden [4]).

Die Indicatoren, die auf etwaige Übereinstimmung mit den elektrometrisch gefundenen Wasserstoffionenkonzentrationen im folgenden untersucht wurden, waren aus den eben erwähnten Gründen nur die vier: Günzburgs Reagens, Boas' Reagens, Dimethyl-amido-azo-benzol und Kongopapier; außerdem ist die Gesamtacidität mittels Lackmuspapier und Phenolphthalein bestimmt worden, aber die Besprechung dieser letzten Zahlen gehört in einen späteren Abschnitt.

Da Boas' Reagens sich ganz wie Günzburgs Reagens verhielt, wurde es nur in wenigen (12) Fällen, die nicht in den Tabellen aufgeführt sind, benutzt. Günzburgs Reagens wurde vorgezogen, weil es einen ein wenig besseren Umschlag zu haben scheint; der Unterschied ist jedoch nicht groß. Dafür ist Boas' Reagens wohlfeiler und hält sich viel besser; es ist also zum praktischen Gebrauch vorzuziehen.

---

[1]) J. Boas, Centralbl. f. klin. Med. 1888, S. 817.

[2]) L. Michaelis und H. Davidsohn, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 8, 398, 1911.

[3]) A. Müller, Medizin. Klinik 1909, S. 1438.

[4]) Johanne Christiansen, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 102, 103 und 456, 1911.

Es zeigte sich schnell, daß eben die Indicatoren, die einen guten Umschlag gaben, auch in anderen Beziehungen von besonderem Interesse waren, und es mag daher genügen, die Titrierungen mit den fünf gewählten Indicatoren, nämlich Phenolphthalein, Lackmuspapier, Kongopapier, Dimethyl-amido-azo-benzol und Günzburgs Reagens zu beschreiben.

Phenolphthalein: Mit Phenolphthalein wurde titriert bis zur ersten Spur von bleibender roter Farbe. Die Anweisungen zu dieser Titrierung, die man in der Literatur findet, sind höchst verschieden, und nicht wenige Verfasser (z. B. Töpfer) empfehlen zu kirschroter Farbe zu titrieren. Wenn man zu so starker roter Farbe titriert, bleibt es indes immer dem freien Ermessen überlassen, wann man mit dem Natronzusatz aufhören soll, und diese Methode ist daher nicht empfehlenswert, wogegen der erste Umschlag von farbloser zu roter Farbe gewöhnlich sehr leicht zu erkennen ist. Die Titrierungen wurden immer in weißer Porzellanschale bei Umrühren mit einem Spatel vorgenommen. Man hat gegen diese Methode eingewendet, daß wegen des leichten Zutritts der atmosphärischen Kohlensäure zur Oberfläche der Lösung zu viel Natriumhydroxyd bis zum Umschlag mit Phenolphthalein gebraucht wird, wogegen dieses bei Titrierung im Glaskolben mit engem Halse vermieden werden sollte. Diese Fehlerquelle wird indessen von der großen Deutlichkeit weit aufgewogen, mit der der Phenolphthaleinumschlag in der weißen Schale erkannt wird.

Bei vergleichenden Titrierungen in Schale und Kolben zeigte es sich denn auch, daß die rote Farbe in den meisten Fällen früher in der Schale als in dem Kolben (gegen weißen Hintergrund beobachtet) bemerkt wurde, weshalb die Zahlen im ersten Fall niedriger wurden, obgleich die Kohlensäure in entgegengesetzter Richtung wirkt. Die folgenden Titrierungen zeigen dies deutlich. Titrierungen mit Phenolphthalein als Indicator zu schwach roter Farbe:

In weißer Schale:	50	51	56	57	98	77	118	115	129	62	59	105
Im Glaskolben:	50	52	60	60	100	77	119	116	132	63	61	108

Der Umschlagspunkt des Phenolphthaleins von farbloser zu schwach roter Farbe liegt ungefähr beim Wasserstoffionenexponenten 8,4, also auf der alkalischen Seite des Neutralpunktes (Fig. 1).

Lackmuspapier: Die Lackmustitrierung ist nach den von S. P. L. Sörensen gegebenen Vorschriften vorgenommen, indem neutrales Lackmuspapier und Vergleichslösung (gleiche Teile von $^{mol}/_{15}$ primärem und $^{mol}/_{15}$ sekundärem Natriumphosphat) verwendet sind. Destilliertes Wasser ist zum Vergleich nicht verwendbar, da es oft wegen Verunreinigungen mit neutralem Lackmuspapier deutlich sauer reagiert. Bei Benutzung des im Handel vorkommenden blauen und roten Lackmuspapiers ist der Umschlag sehr oft schwer zu erkennen, indem „amphotere“ Reaktion auftritt, d. h. das blaue Papier wird rot gefärbt, während das rote sich gleichzeitig blau färbt. Dieses Phänomen wird nicht von

Eigentümlichkeiten der Lösung verursacht, sondern findet infolge von Fehlern bei der Herstellung des Lackmuspapiers statt. Gutes neutrales Lackmuspapier wird nach den Vorschriften S. P. L. Sörensens folgendermaßen dargestellt: 0,5 g Azolithmin + 200 ccm kochendes Wasser + 22,5 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH wird filtriert und danach 50 ccm Alkohol zugesetzt. Filtrierpapier wird in die Lösung getaucht und auf einer säurefreien Stelle getrocknet.

Kongopapier: Mit Kongopapier wurde stets titriert, bis ein Tropfen vom Mageninhalt, auf einen Streifen vom Papier gesetzt, dieses nicht mehr blau färbt. Dieser Umschlag ist gewöhnlich bei Titrierung vom Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück deutlich zu erkennen; enthält die Lösung aber größere Mengen von Albumosen, so ist er oft undeutlich, und man muß daher zu einer Vergleichslösung seine Zuflucht nehmen. Zu diesem Zweck ist eine $^{mol}/_{10}$-Lösung von sekundärem Natriumcitrat, das die Farbe des Kongopapiers nicht ändert, benutzt; auch eine Lösung von $^{mol}/_{15}$ primärem Natriumphosphat kann als Vergleichslösung fungieren. Destilliertes Wasser kann man nicht verwenden, da es das Papier röter färbt, als es am Umschlagspunkt ist; derselbe liegt ungefähr beim Wasserstoffionenexponenten 4,6 (Fig. 1), also auf der sauren Seite des Neutralpunktes.

Kongo ist als Indicator von S. P. L. Sörensen stark kritisiert worden, indem es in Gegenwart von genuinen Proteinstoffen und teilweise auch von deren Abbauprodukten ganz unbrauchbar wird.

Diese Kritik gilt indessen, wie der Verfasser selbst hervorhebt, nur für Kongorot in Lösung; hinsichtlich der Zuverlässigkeit dieses Indicators in Papierform liegen keine Untersuchungen vor. Diese Frage ist nicht identisch mit der Frage von der Verwendbarkeit des Kongopapiers als Indicator freier Salzsäure; wenn auch diese letzte Frage verneinend beantwortet werden muß, kann doch das Kongopapier zu anderen Zwecken ein brauchbarer Indicator sein, vorausgesetzt, daß es einen konstanten Umschlagspunkt hat.

Um dieses Verhalten in bezug auf die geplanten Untersuchungen von Mageninhalt zu prüfen, habe ich an fünf Filtraten von Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück (Tabelle I, Nr. 1 bis 5) und an einen reinen Magensaft (Tabelle I, Nr. 6) elektrometrische Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration am Umschlagspunkte des Kongopapiers, d. h. nach Zusatz von $^{n}/_{10}$-NaOH zum Filtrat, bis die blaue Farbe des Papiers eben verschwunden war, vorgenommen. In diesen Untersuchungen wurde keine Vergleichslösung benutzt, sondern der Umschlag wurde direkt geschätzt. Die Resultate waren die folgenden:

Tabelle I.

Nr.	Name	p_H in kongoneutralem Filtrat	Nach weiterem Zusatz von NaOH $^n/_{10}$-NaOH ccm	Nach weiterem Zusatz von NaOH p_H	Ph — G
1	M. B.	4,51	+ 0,35	4,88	47
2	J. L.	4,75			44
3	E. R.	4,12	+ 0,5	5,4	36
4	K. N.	4,50	+ 0,5	5,43	40
5	M. P.	4,52			42
6	M. P.	4,78			10

Durchschnittszahl 4,53.

In der Tabelle bedeutet p_H den Wasserstoffionenexponenten; Ph — G ist die Differenz zwischen Phenolphthaleinzahl und Günzburg-Zahl.

Die Durchschnittszahl von den in den sechs Fällen gefundenen Wasserstoffionenexponenten ist 4,53, was recht gut mit dem Umschlagspunkt des Kongopapiers stimmt; derselbe ist nämlich ca. 4,6, sowohl in Phosphatmischungen, als auch in einer Mischung von Citrat und Salzsäure bestimmt. Die Wasserstoffionenexponenten variieren in den Versuchen zwischen 4,12 und 4,78; diese Variationen scheinen vielleicht recht groß zu sein; sie sind aber in der Tat nicht größer als die durch Fehler bei der Neutralisation mit Natron verursachten Differenzen, und es ist also nicht nötig, sie Fehlern durch das Kongopapier zuzuschreiben. Die Filtrate sind durch Zusatz von $^n/_{10}$-NaOH neutralisiert, und um zu wissen, eine wie große Rolle eine kleine Fehltitrierung für die Wasserstoffionenkonzentration am Umschlagspunkt des Kongopapiers spielen kann, ist es nötig zu untersuchen, wie stark der Wasserstoffionenexponent sich ändert, wenn z. B. $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-NaOH zu 10 ccm von der kongoneutralen Lösung weiter zugesetzt wird. Dies ist in den Fällen 1, 3 und 4 in der Tabelle I vorgenommen, und die Resultate finden sich in der 2. und 3. Kolonne.

Man kann aus diesen Zahlen berechnen, daß eine Fehltitrierung um z. B. 0,2 ccm eine Änderung des Wasserstoffionenexponenten um 0,2 bis 0,5 verursachen kann, während die größte Abweichung von der Durchschnittszahl in den 6 untersuchten Fällen 0,41 war (Fall 3). Die gefundenen Abweichungen

muß man also wahrscheinlich kleinen Titrierungszahlen zuschreiben.

Diese Ansicht wird auch von der 4. Kolonne der Tabelle unterstützt, in welcher die Zahlen die Differenzen zwischen den Titrierungszahlen mit Phenolphthalein und Günzburgs Reagens bedeuten, indem die größten Abweichungen von der Durchschnittszahl der geringsten Differenz zwischen diesen Indicatoren entsprechen (Fall 3 und 6).

Das Resultat dieser Untersuchungen ist das folgende: Das Kongopapier hat bei Titrierungen von Mageninhalten nach Ewalds Probefrühstück einen tadellosen Umschlag, der an derselben Stelle (p_H ca. 4,6), die bei Untersuchungen von reinen Phosphat- oder Citratmischungen gefunden wird, belegen ist.

Das verwendete Kongopapier habe ich stets selbst folgendermaßen hergestellt: 1 g Kongorot wird in 500 ccm destillierten Wassers gelöst, und dazu werden 200 ccm Alkohol, um das Trocknen des Filtrierpapiers zu beschleunigen, zugesetzt; dieses letztere wird in die Lösung getaucht und danach an einer säurefreien Stelle zum Trocknen aufgehängt. Das Kongopapier, das im Handel vorkommt, ist oft verblichen oder hat eine schmutzig rote Farbe, weshalb der Umschlag nicht so deutlich ist, wie bei dem von mir verwendeten stark roten Kongopapier. Der Unterschied bei Titrierung mit gutem oder schlechtem Kongopapier kann recht bedeutend sein (bis zu 10 bei Ewalds Probefrühstück).

Dimethyl-amido-azo-benzol: Dieser Indicator wurde in alkalischer Lösung verwendet, und es wurde titriert, bis die rote Farbe vollständig verschwunden war. Wie schon erwähnt, war es oft schwierig, diesen Umschlag genau zu bestimmen.

Phloroglucinvanillin (Günzburgs Reagens): Dieses Reagens (Phloroglucin 2 g, Vanillin 1 g, abs. Alkohol 30 g) weicht in verschiedenen Beziehungen von den übrigen Indicatoren ab. Die Reaktion wird, nach Steensma[1]), folgendermaßen vorgenommen: Mittels einer Impfnadel (Boas) wird ein Tropfen des Reagens auf eine weiße Porzellanschale gebracht, wo es über einer Spiritusflamme eingetrocknet wird. Mitten in den eingetrockneten hellgelben Fleck wird ein Tropfen von der zu untersuchenden Lösung gesetzt, und es wird wieder vorsichtig erwärmt; falls Salzsäure vorhanden ist, erscheint ein roter Streifen

---

[1]) F. A. Steensma, diese Zeitschr. 8, 210, 1908.

oder Fleck. Es ist von Wichtigkeit, nicht weiter zu erwärmen, nachdem der Tropfen eingetrocknet ist, da sonst eine, die Salzsäurereaktion verdeckende, vom verbrannten Zucker des Mageninhalts herrührende, dunkelbraune Farbe auftritt. Das Reagens ist, frisch zubereitet, ungefähr farblos, ändert sich aber schnell unter dem Einfluß des Lichtes, wodurch es braun wird. Es soll daher in schwarzen Flaschen, ohne Zutritt des Lichtes, aufbewahrt werden.

Die Titrierung mit Phloroglucinvanillin als Indicator ist recht zeitraubend, da man ja das beschriebene Verfahren für jeden Zusatz von Natron wiederholen muß; dafür ist der Umschlag bei einiger Übung sehr scharf und deutlich. Die positive Reaktion ist rot, die negative gelb; falls eine braune Farbe auftritt, hat man den erwähnten Fehler, zu stark zu erwärmen, begangen, oder das Reagens selbst ist unter dem Einflusse des Lichtes braun geworden.

C. Vergleichende Versuche mit der elektrometrischen Methode und den Titrierungsmethoden.

Die folgende Tabelle II[1]) umfaßt Untersuchungen von Filtraten vom Mageninhalt, der 1 Stunde nach Ewalds Probefrühstück bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten heraufgeholt wurde.

In den Tabellen II bis V bedeuten:

C_H: die Wasserstoffionenkonzentration,

$C_H \cdot 1000$: die Wasserstoffionenkonzentration, in Titrierungszahlen angegeben,

$C_{HCl} \cdot 1000$: die Konzentration freier Salzsäure, in Titrierungszahlen angegeben und aus der Wasserstoffionenkonzentration mittels der Dissoziationsgrade der Salzsäure (nach Kohlrausch) berechnet,

G: Günzburgs Reagens
D: Dimethyl-amido-azo-benzol } „freie Salzsäure",
K: Kongopapier

L: Lackmuspapier
Ph: Phenolphthalein } „Gesamt-Acidität".

---

[1]) Der größte Teil dieser Tabelle ist früher veröffentlicht (J. Christiansen, Deutsches Arch. f. klin. Med. 102, 108 u. 456, 1911). In vier Fällen, nämlich Nr. 34 bis 37, sind die elektrometrischen Messungen von Chr. Lundsgaard zu anderen Zwecken ausgeführt, und in den Fällen 38 und 39 hat S. Palitzsch diese Messungen ausgeführt und sie mir zur Vergleichung mit den Titrierungen gütigst überlassen.

Tabelle II.

Filtrate vom Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück.

Nr.	Name	C_H	$C_H \cdot 1000$	$C_{HCl} \cdot 1000$	G	D	K	L	Ph
1	S. J.	0,0003	0	0	—	—	4	—	20
2	J. N.	0,033	33	34	—	—	41	60	66
3	M. B.	0,004	4	4	—	—	23	—	47
4	J. L.	0,036	36	38	—	—	62	—	85
5	E. K.	0,004	4	4	Spur	—	17	—	33
6	M. P.	0,018	18	19	10 bis 15	—	38	—	59
7	R.	0,022	22	23	15 „ 20	—	38	—	51
8	K. N.	0,025	25	26	20 „ 25	—	44	—	—
9	M. S.	0,056	56	59	42 „ 48	64	68	82	88
10	M. J.	0,040	40	42	40 „ 45	54	59	67	78
11	A. H.	0,074	74	81	75 „ 80	86	87	91	97
12	C. O.	0,011	11	11	8	20	36	45	64
13	A. H.	0,017	17	18	14	34	44	51	69
14	M. B.	0,036	36	38	36	—	54	—	75
15	H.	0,025	25	26	23	37	44	52	65
16	J. F.	0,0002	0	0	0	—	66	—	120
17	L. C.	0,005	5	5	0	12	24	35	55
18	M. P.	0,016	16	17	8	24	35	44	64
19	P. H.	0,012	12	12	8	21	33	42	61
20	C.	0,063	63	67	66	—	79	83	93
21	C. J.	0,055	55	58	63	—	76	81	91
22	D. M.	0,039	39	41	40	52	62	68	83
23	A. A.	0,023	23	24	21	42	46	52	74
24	M. S.	0,022	22	23	23	35	38	42	53
25	A. A.	0,035	35	37	42	58	62	67	81
26	C. N.	0,046	46	48	50	67	72	76	87
27	C. P.	0,028	28	29	25	41	48	51	72
28	M. S.	0,036	36	38	44	46	59	64	78
29	A.	0,013	13	13	13	20	21	22	29
30	D. H.	0,046	46	48	52	66	66	71	81
31	C. H.	0,000005	0	0	0	0	0	2	25
32	S. L.	0,0003	0	0	0	0	13	21	44
33	R. G.	0,027	27	28	28	—	49	—	70
34	B. E.	0,022	22	23	23	—	50	63	78
35	R. M.	0,032	32	33	32	—	44	53	59
36	E. B.	0,018	18	19	14	—	44	55	67
37	J. W.	0,031	31	32	30	—	45	52	59
38	S. P.	0,025	25	26	25	—	53	64	77
39	P. S.	0,042	42	44	39	—	59	70	80

Es geht aus der Tabelle II hervor, daß sowohl Dimethylamido-azo-benzol, wie auch Kongopapier Zahlen aufweisen, die alle bedeutend höher sind als die tatsächlichen Wasserstoffionenkonzentrationen, als Titrierungszahlen ($C_H \cdot 1000$) ausgedrückt, während die Günzburg-Zahlen recht gute Übereinstimmung mit diesen zeigen. Die größte Abweichung zeigt das Kongopapier, dessen Zahlen durchschnittlich 20 höher als die Wasserstoffionenkonzentrationen sind. Milchsäure hat keine

Schuld an diesen Abweichungen, da dieselbe nur in einem Falle (Nr. 16) zugegen war; die Untersuchungen zeigen also, daß Kongopapier als Indicator freier Salzsäure ganz unbrauchbar ist, weil es einen bedeutenden Fehler macht, und weil dieser Fehler in der Größe sehr variiert. Bei Ewalds Probefrühstück variiert derselbe z. B. von 10 bis zu 30, bei fleischreichen Mahlzeiten (Tabelle IV) von 30 bis zu 80, und bei reinem Magensaft nur von 5 bis zu 10 (Tabelle III). Bei Titrierung von reinem Magensaft gibt das Kongopapier also nur einen kleinen Fehler, und hierin liegt die Ursache, weshalb P. Fränkel[1]), C. Foa[2]) und Fr. Tangl[3]) das Kongopapier als brauchbar ansehen; sie haben nämlich nur mit reinem Magensaft gearbeitet, wogegen Michaelis und Davidsohn[4]), die Mageninhalte nach Ewalds Probefrühstück untersucht haben, Methylorange (das etwa dieselben Zahlen wie Kongorot gibt) vollständig verwerfen.

Auch Dimethyl-amido-azo-benzol gibt keine brauchbaren Zahlen, obgleich der Fehler hier nicht so groß ist wie bei dem Kongopapier. Der durchschnittliche Fehler ist 12 (in 21 Fällen).

Der Indicator, dessen Zahlen sowohl in der Tabelle II wie auch in den folgenden Tabellen III bis V die beste Übereinstimmung mit der Wasserstoffionenkonzentration zeigen, ist Günzburgs Reagens. In den Fällen 5 bis 11 in der Tabelle II sind die Zahlen für dieses Reagens nicht genau angegeben, weil die Technik im Beginne mangelhaft ausgeführt wurde, und die Zahlen sind daher niedriger, als sie wahrscheinlich bei guter Technik gewesen wären. Rechnet man nur mit den letzten 28 Fällen, so ist der Unterschied zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und der Günzburg-Zahl in 7 Fällen 0, in 5 Fällen 1, in 2 Fällen 2, in 5 Fällen 3, in 3 Fällen 4, in 1 Fall 5, in 1 Fall 6, in 1 Fall 7, in 3 Fällen 8. Die durchschnittliche Abweichung ist ca. 3.

Die Übereinstimmung ist also ganz gut, aber nicht voll-

---

[1]) P. Fränkel, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 1.

[2]) C. Foa, Compt. rend. Soc. Biol. 1, 865, 1905.

[3]) Fr. Tangl, Arch f. d. ges. Physiol. 115, 64, 1906.

[4]) L. Michaelis u. H. Davidsohn, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 8, 398, 1911.

ständig, und die gefundenen Abweichungen sind ein wenig größer, als technische Fehler sie verursachen könnten. Um dieses zu erklären, wird es nötig sein, die Richtung und Größe der einzelnen Abweichungen für sich zu betrachten. Bei Untersuchung der 6 größten Abweichungen ($\geqq$ 5), die man jedenfalls nicht Versuchsfehlern zuschreiben kann, ersieht man, daß bei 4 von diesen (Nr. 25, 28, 30 und 21) recht hohe Wasserstoffionenkonzentrationen, nämlich 35, 36, 46 und 55 sich finden, und in allen diesen Fällen sind die Abweichungen der Günzburg-Zahlen positiv, d. h. sie sind höher als die Wasserstoffionenkonzentrationen und liegen den von diesen berechneten Werten von freier Salzsäure am nächsten. Im Gegensatz hierzu finden sich die beiden letzten der sechs großen Abweichungen (Nr. 17 und 18) bei den niedrigen Wasserstoffionenkonzentrationen 5 und 16 und sind negativ, d. h. die Günzburg-Zahlen sind niedriger als die entsprechenden Wasserstoffionenkonzentrationen. Auch Abweichungen, die kleiner als 5 sind und die also teilweise unter die Fehlergrenze kommen, verteilen sich größtenteils auf ähnliche Weise: bei niedrigen Aciditäten sind die Abweichungen negativ, bei hohen Aciditäten positiv, und bei den dazwischen liegenden Zahlen sind sie abwechselnd positiv und negativ, aber stets von kleiner Größe.

Dieses Verhältnis gibt einen Fingerzeig für die Richtung, wo man die Erklärung der Sonderstellung des Phloroglucin-Vanillins suchen muß. Nimmt man nämlich an, daß Günzburgs Reagens im Gegensatz zu allen anderen Indicatoren kein Indicator der Wasserstoffionenkonzentration, sondern ein einigermaßen spezifischer Indicator der freien Salzsäure ist, dann hat man eine Erklärung der in entgegengesetzter Richtung gehenden Abweichungen bei hohen und niedrigen Aciditäten. Bei hohen Aciditäten muß man annehmen, daß die Wasserstoffionenkonzentration von der großen Menge freier Salzsäure dominiert wird; diese ist nämlich beinahe vollkommen dissoziiert und wird daher die Dissoziation anderer anwesender Stoffe zurückdrängen. Bei der Titrierung erreicht man deshalb Zahlen, die mit den von den Wasserstoffionenkonzentrationen berechneten Werten für freie Salzsäure gut übereinstimmen, die aber höher als die tatsächlichen Wasserstoffionenkonzentrationen sind. Dagegen werden bei den niedrigen Zahlen auch Wasserstoff-

ionen, die von anderen Stoffen herrühren, zur Geltung kommen, namentlich wenn sie in starker Konzentration, der Menge freier Salzsäure gegenüber, zugegen sind; die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung wird somit nur teilweise von der freien Salzsäure, deren Menge durch Titrierung mit Günzburgs Reagens als Indicator bestimmt wird, herrühren; ein anderer Teil stammt von Wasserstoffionen anderen Ursprungs, die also nicht diese Reaktion geben.

Diese Theorien finden ihre Bestätigung bei Betrachtung der folgenden Tabellen, die Untersuchungen von reinem Magensaft von Patienten mit Hypersekretion (Tabelle III), ferner von Mageninhalt nach verschiedenen fleischreichen Mahlzeiten (Tabelle IV) und endlich Untersuchungen von salzsauren Lösungen von Witte-Pepton (Tabelle V) umfassen.

Tabelle III.

Reiner Magensaft.

Nr.	Name	C_H	$C_H \cdot 1000$	$C_{HCl} \cdot 1000$	G	K	L	Ph
1	M. P.	0,035	35	37	38	42	—	47
2	P. H.	0,035	35	37	33	45	—	55
3	A. H.	0,037	37	39	43	54	—	62
4	M. S.	0,022	22	23	25	30	—	38
5	A. A.	10^{-9}	0	0	0	0	−16	4
6	A. H.	0,035	35	37	33	44	—	51
7	H. H.	0,0725	72	79	77	83	—	88
8	A. T.	0,039	39	42	45	52	57	59
9	A. T.	0,0559	56	59	58	64	—	71

Es ist aus Tabelle III ersichtlich, daß die Abweichungen der Günzburg-Zahlen von den Wasserstoffionenkonzentrationen zwischen 2 und 6 variieren, und sie sind in 6 von 9 Fällen positiv, was wie bei den analogen Fällen in der vorigen Tabelle den recht hohen Aciditäten zugeschrieben werden muß. Der Fall 7 ist besonders lehrreich in dieser Beziehung. Eine genauere Betrachtung verdient auch Nr. 5 der Tabelle. Dieser Magensaft war wegen Verunreinigung mit Galle gelb und reagierte alkalisch auf Lackmus, welches mit negativen Zahlen angegeben ist (Titrierung mit $^n/_{10}$-HCl). Die Reaktion mit Phenolphthalein ist dagegen sauer, trotzdem die Wasserstoffionenkonzentration (10^{-9}) stärker alkalisch als der Umschlagspunkt des Phenolphthaleins ($10^{-8,4}$) war. Die wahrscheinliche Ursache hierzu muß

man darin suchen, daß Kohlensäure durch den Wasserstoffstrom ausgejagt wird, wodurch die Lösung während der elektrometrischen Messung mehr alkalisch als ursprünglich wird. Die Kohlensäure spielt in salzsaurem Mageninhalt keine Rolle; in einem alkalischen Magensaft wie dem hier erwähnten kann sie aber sehr wohl den Unterschied zwischen der elektrometrisch gefundenen Wasserstoffionenkonzentration (10^{-9}) und der von den Lackmus- und Phenolphthalein-Zahlen geschätzten (ca. 10^{-8}) bedingen. In solchen Fällen wird man die Hasselbalchsche Schaukelmethode der Methode der strömenden Wasserstoffatmosphäre wohl vorziehen.

Die Differenzen zwischen den Titrierungszahlen der Indicatoren sind in Tabelle III recht klein wegen der geringen Menge von Peptonen. Im Gegensatz hierzu zeigt die Tabelle IV außerordentlich große Differenzen, weil die hier verwendeten Probemahlzeiten recht große Mengen Fleisch enthalten.

Tabelle IV.
Filtrate von Mageninhalt nach verschiedenen Mahlzeiten.

Nr.	Name	Mahlzeit	Aufgeholt nach Std.	C_H	$C_H \cdot 1000$	$C_{HCl} \cdot 1000$	G	K	L	Ph
1	O. O.	250 g Hafersuppe, 50 g Fleisch, 4 Stck. Weißbrot	$3^1/_2$	0,032	32	34	36	64	—	91
2	J. N.	250 g Hafersuppe, 100 g Fleisch, 4 Stck. Weißbrot	2	0,008	8	8	8	41	54	67
3	B. N.	250 g Hafersuppe, 100 g Fleisch, 2 Stck. Weißbrot	3	0,021	21	22	13	100	—	190
4	E. G.	250 g Milch, 100 g Fleisch, 2 Stck. Weißbrot	$2^1/_2$	0,062	62	67	71	91	109	117
5	E. B.	250 g Bouillon, 100 g Fleisch, 2 Stck. Weißbrot	2	0,0007	1	1	−24	30	72	90
6	E. B.	250 g Bouillon, 100 g Fleisch, 2 Stck. Weißbrot	3	0,0015	1	1	−21	54	104	132
7	E. B.	250 g Bouillon, 50 g Fleisch, 2 Stck. Weißbrot	3	0,0024	2	2	−12	65	97	135
8	A. B.	250 g Bouillon, 100 g Fleisch	2	0,0022	2	2	−15	65	—	140

Diese Tabelle (Tabelle IV) illustriert besonders die bei niedrigen Aciditäten gefundene negative Abweichung der Günzburg-Zahlen. Im Falle 3, der die größte Peptonmenge (Ph — G = 177) zeigt, ist die Wasserstoffionenkonzentration 21, während die Günzburg-Zahl nur 13 ist; in den Fällen 5 bis 8 sind die Günzburg-Zahlen negativ (d. h. man muß Salzsäure zusetzen, bis die Reaktion erscheint), obgleich die Wasserstoffionenkonzentration 1 bis 2 ist, das zur positiven Reaktion mit Günzburgs Reagens ausreichen würde, falls die anwesenden Wasserstoffionen von freier Salzsäure herrührten. Diese vier Fälle zeigen zugleich schlagend, wie große Fehler man begehen kann, wenn man die Kongozahlen als Maß für die Wasserstoffionenkonzentrationen benutzt. Die Kongozahlen sind nämlich in diesen Fällen bzw. 30, 54, 65 und 65, also recht hoch, während die tatsächliche Wasserstoffionenkonzentration sehr klein ist (1 bis 2) und freie Salzsäure ganz fehlt.

Dasselbe geht aus den Zahlen in der Tabelle V hervor, wo Lösungen von Witte-Pepton in verschiedenen Mengen Salzsäure untersucht wurden.

Tabelle V.
Witte-Pepton, in Salzsäure gelöst.

Nr.	Pepton %	C_H	$C_H \cdot 1000$	$C_{HCl} \cdot 1000$	G	K	L	Ph
1	ca. $1^1/_2$	0,029	29	31	34	53	64	71
2	ca. $1^1/_2$	0,006	6	6	6	24	—	42
3	ca. 8	0,0074	7	7	0	ca. 105	—	ca. 215
4	ca. 4	0,0048	5	5	0	52	—	108
5	ca. 2	0,0033	3	3	0	26	—	52

Die Fälle 3 bis 5 betreffen Lösungen von Witte-Pepton in Salzsäure, wo die Salzsäuremenge so abgemessen ist, daß die Lösung eben keine Reaktion mit Günzburgs Reagens gibt, d. h. daß freie Salzsäure nicht zugegen ist. Diese Fälle zeigen daher, wie große Wasserstoffionenkonzentration das Pepton-Hydrochlorid in verschiedenen Konzentrationen haben kann. In der am meisten konzentrierten Lösung (ca. 8% Witte-Pepton) war die Wasserstoffionenkonzentration 7, in den niedrigsten (ca. 2%) war dieselbe 3, und auch diese Zahlen stützen also die früher erwähnte Anschauung über die Natur der Günzburgschen Reaktion.

Außer dem Pepton-Hydrochlorid finden sich im Mageninhalt andere Säuren oder Salze, die imstande sind, Wasserstoffionen abzugeben, oder die die Dissoziation der gegenwärtigen freien Salzsäure vermindern können. Es ist daher

kein Wunder, daß die Übereinstimmung mit den Günzburg-Zahlen und den berechneten Konzentrationen freier Salzsäure keine vollständige ist, denn die Berechnung dieser letzteren ist unter der unrichtigen Voraussetzung vorgenommen, daß die Menge der Wasserstoffionen von der freien Salzsäure allein abhängt. Dieses kann in so unreinen Lösungen nicht der Fall sein, und man wird daher aus den vier Tabellen keinen vollkommenen Beweis dafür entnehmen können, daß man mit Günzburgs Reagens die freie Salzsäure mit großer Genauigkeit bestimmen kann.

Ein solcher stringenter Beweis kann überhaupt kaum gegeben werden, da die gewöhnlichen chemischen und physikalischen Methoden Wasserstoffionen verschiedenen Ursprungs nicht trennen können. Um zu zeigen, daß Günzburgs Reagens tatsächlich imstande ist anzuzeigen, ob Wasserstoffionen von Salzsäure oder von anderen Quellen stammen, wird es somit nötig sein, die Frage durch verschiedenartige Versuche allseitig zu beleuchten.

Zuerst soll erwähnt werden, daß sich in der Literatur Beobachtungen finden, die sich in derselben Richtung bewegen.

So hat Paal[1]) 1892 Salze von Peptonen mit Salzsäure, also Peptonhydrochloride dargestellt. Alle diese Salze färbten Kongopapier kräftig blau, wogegen sie mit Günzburgs Reagens keine Reaktion gaben. Die Salzsäure schien an die Peptone sehr fest gebunden zu sein.

Ähnliche Resultate ergaben Versuche von Sjöquist[2]) 1895 und Cohnheim[3]) 1896.

Sjöquist fand nämlich bei Leitfähigkeitsbestimmungen, daß der Phloroglucin-Vanillin-Umschlag (und der Benzopurpurin-Umschlag) mit dem theoretisch „neutralen" Punkte recht gut übereinstimmt, dagegen konnte man mit der Kongo-Reaktion auch einen Teil der gebundenen Salzsäure nachweisen. Zu demselben Resultat kam Cohnheim mittels der Rohrzucker-Inversionsmethode Hoffmanns, indem Günzburgs Reagens (und Tropäolin) sich als sehr brauchbar zeigten, im Gegensatz zu Kongopapier, das zu hohe Zahlen gab.

Die Untersuchungen dieser Verfasser waren indes nur gering an Zahl und außerdem nur an künstlichen Mischungen vorgenommen; sie können daher nur als Stützen, nicht als eigentliche Beweise für die in Frage stehende Sache dienen, um so mehr, als keiner von den Ver-

---

[1]) C. Paal, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **1892**, 1202 u. **1894**, 1827.
[2]) J. Sjöquist, Skand. Arch. f. Physlol. **5**, 277, 1895.
[3]) O. Cohnheim, Zeitschr. f. Biol. **33**, 489, 1896.

fassern den Wesensunterschied zwischen Günzburgs Reagens und den übrigen Indicatoren hervorgehoben hat.

Nichtsdestoweniger ist die Auffassung von Günzburgs Reagens als spezifisches Reagens für freie Salzsäure von zahlreichen Klinikern gehegt worden, allerdings zu einer Zeit, wo auch andere Indicatoren als spezifisch für freie Säuren angesehen wurden. So hebt schon Günzburg[1]) 1887 hervor, daß Phloroglucin-Vanillin der einzige Indicator freier Salzsäure ist, während die anderen Indicatoren (Kongo usw.) auch freie organische Säuren andeuten. Dagegen meinte sowohl Günzburg als auch die meisten anderen Kliniker, daß Kongopapier in Abwesenheit organischer Säuren zuverlässige Zahlen für freie Salzsäure gäbe, und diese Anschauung ist auch heutzutage die gewöhnliche.

Die obenstehenden Untersuchungen haben indes gezeigt, daß Kongopapier nicht nur auf organische Säuren, sondern auch auf salzsaure Peptone, wenn diese nur eine hinreichend hohe Wasserstoffionenkonzentration haben, reagiert. Dagegen ist, wie es in dem Folgenden weiter klar gemacht werden soll, Günzburgs Reagens nicht direkt von der anwesenden Wasserstoffionenkonzentration abhängig, sondern sein positiver oder negativer Ausschlag hängt davon ab, ob diese Wasserstoffionenkonzentration von einer Säure herrührt, die imstande ist, beim Eintrocknen eine gewisse hohe Acidität (etwa = n-HCl) zu erreichen oder nicht.

Wie erwähnt, zeigt sich die positive Günzburgsche Reaktion durch Auftreten einer roten Farbe während des Eintrocknens einer Mischung des Reagens und der salzsäurehaltigen Lösung.

Die rote Farbe rührt von der Bildung eines roten, krystallinischen Stoffes ($C_{20}H_{18}O_8$) her, der aus der Verbindung von zwei Molekülen Phloroglucin ($C_6H_6O_3$) und einem Molekül Vanillin ($C_8H_8O_3$) unter Austritt von einem Molekül Wasser hervorgeht[2]).

Diese Reaktion fällt nur positiv aus in der sehr hohen Wasserstoffionenkonzentration, die bei Eindampfung der vorliegenden Lösung erreicht wird. Um zu wissen, wie hoch diese zum Eintritt der Reaktion nötige Wasserstoffionenkonzentration ist, muß man die Reaktion ganz wie andere Indicator-Reaktionen bei Zusatz von einigen Tropfen des Indicators zu Lösungen von verschiedener Acidität in der Kälte vornehmen. Es zeigt sich bei solchen Untersuchungen, daß die erste Spur von roter Farbe

---

[1]) A. Günzburg, Centralbl. f. klin. Med. 1887, S. 737.

[2]) Beilstein, Handbuch der organ. Chemie 1886.

(ein hellroter Niederschlag) sich bei n-HCl zeigt, während niedrigere Aciditäten keine Reaktion geben.

Man muß also die Wirkung des Indicators so auffassen, daß sie, wie die anderer Indicatoren benutzt, ganz wie diese von einer gewissen, allerdings sehr hohen Wasserstoffionenkonzentration bedingt ist. Der Unterschied von den übrigen Indicatoren hängt nur von der eigentümlichen Technik ab, indem die Säuren, die fähig sind, beim Eintrocknen hohe Wasserstoffionenkonzentrationen zu erreichen, positive Reaktion geben, die anderen dagegen nicht.

Diese Eigenschaft der Konzentrierbarkeit scheint nicht allein von der Stärke der betreffenden Säure abhängig zu sein; so geben die anorganischen Säuren, Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure und Borsäure, alle positive Reaktion, obgleich Borsäure eine außerordentlich schwache Säure ist und Phosphorsäure, jedenfalls in gewissen Konzentrationen, schwächer ist als Ameisensäure, die jedoch keine Reaktion gibt.

Von organischen Säuren geben Oxalsäure, Apfelsäure, Weinsäure und Citronensäure positive, Bernsteinsäure, Propionsäure, Milchsäure, Essigsäure, Buttersäure, Benzoesäure, Ameisensäure und Phthalsäure dagegen negative Reaktion.

Die Günzburgsche Reaktion scheint somit bei krystallinischen Säuren mit mehr als einer Carboxylgruppe positiv zu sein, während keine von den monocarbonischen Fettsäuren positiv reagiert; diese Ordnung ist aber mit der Reihenfolge der Stärke der Säuren nicht identisch. Man muß sich indessen daran erinnern, daß die „Stärke" der Säuren kein ganz einfacher Begriff ist, und außerdem muß man in der vorliegenden Frage auch auf die größtenteils unbekannten Temperaturkoeffizienten der Säuren Rücksicht nehmen.

Man kann also auf diesem Wege die Frage kaum weiter verfolgen; es soll nur hervorgehoben werden, daß man mittels verschiedener Säuren (Milchsäure, Buttersäure usw.) Lösungen mit recht hohen Wasserstoffionenkonzentrationen darstellen kann, die jedoch keine Reaktion mit Günzburgs Reagens geben, während Lösungen mit viel niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen, wenn sie nur Spuren von z. B. Salzsäure enthalten, deutlich positive Reaktion geben. So reagiert $^{n}/_{2500}$-HCl deutlich positiv, wenn man den unter der Technik beschriebenen

ganz kleinen Tropfen zur Reaktion verwendet, und beim Eindampfen größerer Mengen erscheint selbstverständlich die Reaktion bei noch viel größerer Verdünnung. Die variierenden Angaben über die Empfindlichkeit der Reaktion rühren wahrscheinlich nur von der variierenden Größe des einzutrocknenden Tropfens her.

Auch bei Mischungen von Salzsäure mit anderen Stoffen bekannter Zusammensetzung findet man, daß positive Günzburgsche Reaktion auftritt, eben wo freie Salzsäure nach der Berechnung auftreten soll, ganz unabhängig von der Größe der Wasserstoffionenkonzentration. So findet man bei Benutzung der Sörensenschen Puffermischungen[1]), daß freie Salzsäure in der Mischung „Citrat + Salzsäure" bei dem berechneten Punkt „3,3 Citrat" auftritt und sich in positiver Günzburgscher Reaktion zu erkennen gibt, während der Umschlag in der Mischung „Glykokoll + Salzsäure" bei „5,1 Glykokoll" erscheint. Die Wasserstoffionenexponenten waren in diesen beiden Fällen bzw. 2,24 und 1,96, während $^{n}/_{2500}$-HCl, die, wie erwähnt, auch positive Reaktion gibt, den Wasserstoffionenexponenten 3,4 zeigt. Auch diese Versuche zeigen also die relative Unabhängigkeit der Günzburgschen Reaktion von der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Resultate der Untersuchungen dieses Abschnittes sind somit die folgenden:

Die Günzburgsche Reaktion ist, mit der gewöhnlichen Eindampfungstechnik ausgeführt, von der Natur der gegenwärtigen Säure und nicht von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig.

Hinsichtlich der Anwendung der Reaktion in der Klinik bei Untersuchung des Mageninhalts nach Ewalds Probemahlzeit zeigen die Versuche, daß Günzburgs (wie wahrscheinlich auch Boas') Reagens ein vorzüglicher Indicator zur Bestimmung freier Salzsäure bei der Titrierung ist, und daß es auch zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration brauchbar ist, da die hierbei begangenen Fehler nicht groß sind.

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

Untersuchungen über freie und gebundene Salzsäure im Mageninhalt.

II. Mitteilung.

Titrimetrische Untersuchungen über die Pepsinverdauung.

Von

Johanne Christiansen.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Die Bedeutung der Differenzen zwischen den Titrierungszahlen der verschiedenen Indicatoren ist eine Frage, die von dem Gesichtspunkte aus, daß die Indicatoren (Günzburgs Reagens ausgenommen) Wasserstoffionenindicatoren sind, die, wenn die Lösung die für jeden einzelnen Indicator spezifische Wasserstoffionenkonzentration erreicht hat, einen Umschlag geben, vielleicht überflüssig erscheint.

Es zeigte sich indes bei den Versuchen in der vorhergehenden Mitteilung, daß eine eigentümliche Regelmäßigkeit zwischen den Günzburg-, Kongo- und Phenolphthalein-Zahlen vorhanden war, und dieses Verhältnis hat zu den in dieser Mitteilung zu erwähnenden Versuchen Anlaß gegeben. Eine Betrachtung der Tabellen der früheren Mitteilung wird ergeben, daß die Differenzen zwischen Kongo- und Günzburg-Zahlen stets ungefähr ebenso groß sind wie die Differenzen zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahlen. Um zu ermitteln, ob es sich um eine Zufälligkeit oder um eine allgemeine Regel handelte, war es nötig, eine große Anzahl Fälle zu untersuchen, und diese sind in den folgenden Tabellen I bis III gesammelt. (Hier findet sich das ganze Material zur Beleuchtung dieses Verhältnisses, ungeachtet ob dieselben Titrierungen auch in Tabellen zu anderem Zwecke sich vorfinden, zusammengestellt.

In den Tabellen bedeuten:

G.: Günzburg-Zahl.
K.: Kongo-Zahl.
Ph.: Phenolphthalein-Zahl.
K. — G.: Die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahl.
Ph. — K.: Die Differenz zwischen Phenolphthalein- und Kongo-Zahl.

Die Zahlen der Tabellen sind nach der Größe der Kongo-Zahlen geordnet.

Tabelle I.

Filtrate von Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück.

Nr.	Name	G.	K.	Ph.	K. — G.	Ph. — K.
1	F. L.	0	12	26	—	—
2	S. L.	0	13	44	—	—
3	M. O.	0	15	33	—	—
4	C. H.	2	16	28	14	12
5	B. C.	0	17	35	—	—
6	G. K.	9	18	26	9	8
7	A. B.	0	18	38	—	—
8	M. O.	9	20	30	11	10
9	N. M.	3	20	33	17	13
10	L. H.	0	20	43	—	—
11	A.	13	21	29	8	8
12	C. H.	9	23	37	14	14
13	E. A.	3	23	47	20	24
14	H. L.	0	23	46	—	—
15	M. P.	3	23	46	20	23
16	N. R.	16	24	35	8	11
17	M. H.	1	24	54	23	20
18	L. C.	0	24	55	—	—
19	M. H.	7	25	49	18	24
20	J. E.	12	26	37	14	11
21	J. P.	7	26	46	19	20
22	P. L.	6	26	46	20	20
23	B. E.	3	27	53	24	26
24	F. S.	12	28	39	16	11
25	K. L.	10	28	46	18	18
26	J. R.	9	28	48	19	20
27	F.	14	31	44	17	13
28	C. L.	14	31	50	17	19
29	F. E.	14	32	49	18	17
30	P. L.	5	32	54	27	22
31	C. T.	7	32	59	25	27
32	F. S.	20	33	44	13	11
33	L. C.	16	33	48	17	15
34	J. H.	14	33	49	19	16
35	F.	16	33	50	17	17
36	B. P.	12	33	52	21	19
37	E. B.	13	33	55	20	22
38	P. H.	8	33	61	25	28
39	F. S.	18	34	51	16	17
40	H. P.	13	35	48	22	13

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Name	G.	K.	Ph.	K.—G.	Ph.—K.
41	H. D.	23	35	49	12	14
42	S. J.	18	35	52	17	17
43	T. J.	18	35	55	17	20
44	M. P.	8	35	64	27	29
45	C. O.	8	36	64	28	28
46	B.	30	37	45	7	8
47	P. H.	19	37	54	18	17
48	E. R.	26	38	48	12	10
49	J. J.	21	38	51	17	13
50	M. S.	23	38	53	15	15
51	J. H.	24	39	50	15	11
52	F. J.	23	39	52	16	13
53	M. S.	20	39	54	19	15
54	B. F.	19	39	57	20	18
55	B. E.	24	40	61	16	21
56	R. W.	4	40	75	36	35
57	H. H.	31	41	49	10	8
58	F. M.	20	41	60	21	19
59	F.	27	42	56	15	14
60	F. F.	17	42	63	25	21
61	F. E.	15	42	66	27	24
62	M. M.	23	43	64	20	21
63	K. L.	23	43	64	20	21
64	P. J.	23	43	68	20	25
65	M. P.	24	44	65	20	21
66	H.	23	44	65	21	21
67	M. M.	18	44	66	26	22
68	A. H.	14	44	69	30	25
69	F. C.	31	45	60	14	15
70	L. L.	28	45	60	17	15
71	L. L.	28	45	62	17	17
72	C. M.	25	45	61	20	16
73	P. H.	31	46	59	15	13
74	M. L.	30	46	62	16	16
75	L. T.	26	46	64	20	18
76	F. M.	26	46	67	20	21
77	B.	21	46	68	25	22
78	A. A.	21	46	74	25	28
79	E. R.	34	47	59	13	12
80	J. A.	29	47	62	18	15
81	C. P.	16	47	85	31	38
82	M. J.	31	48	68	17	20
83	F. S.	27	48	68	21	20
84	C. P.	25	48	72	23	24
85	J. A.	28	49	65	21	16
86	R. G.	28	49	70	21	21
87	F. W.	27	49	70	22	21
88	L. H.	34	50	67	16	17
89	B. E.	26	50	68	24	18
90	L. U.	23	50	78	27	28
91	L. P.	42	51	60	9	9
92	A. B.	34	51	70	17	19

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Name	G.	K.	Ph.	K. — G.	Ph. — K.
93	J. W.	33	51	65	18	14
94	M. C.	39	52	66	13	14
95	F. O.	41	53	65	12	12
96	O. H.	39	53	67	14	14
97	C. B.	25	53	77	28	24
98	M. B.	36	54	75	18	21
99	A. F.	30	54	74	24	20
100	M. J.	34	54	79	20	25
101	H. M.	31	55	71	24	16
102	L. P.	35	55	80	20	25
103	M. J.	39	56	71	17	15
104	E. P.	45	57	69	12	12
105	T.	42	57	71	15	14
106	E. W.	45	58	74	13	16
107	P. F.	32	58	80	26	22
108	M. S.	44	59	78	15	19
109	N. H.	37	59	79	22	20
110	O. O.	33	59	79	26	20
111	H. F.	49	60	68	11	8
112	G. J.	46	60	69	14	9
113	T.	28	60	90	32	30
114	G. L.	39	61	90	22	29
115	P. H.	46	62	74	16	12
116	A. A.	42	62	81	20	19
117	D. M.	40	62	83	22	21
118	J. R.	54	63	74	9	11
119	M. O.	51	65	80	14	15
120	M. P.	47	65	76	18	11
121	F. S.	43	65	83	22	18
122	F. C.	44	66	81	22	15
123	D. H.	52	66	81	14	15
124	S. A.	49	66	82	17	16
125	R. H.	23	67	104	34	37
126	H. K.	62	72	82	10	10
127	C. M.	50	72	87	22	15
128	H. N.	45	72	92	27	20
129	A. J.	69	74	82	5	8
130	C. H.	59	75	90	16	15
131	T.	46	75	101	29	26
132	H. H.	63	76	89	13	13
133	C. J.	63	76	91	13	15
134	C.	66	79	93	17	14
135	A. R.	70	81	92	11	11
136	P.	68	81	100	13	19
137	A. M.	68	82	96	14	14
138	C. H.	71	85	99	14	14
139	T. M.	71	86	100	15	14
140	C. H.	67	87	107	20	20
141	R. H.	71	89	107	18	18
142	P.	81	91	100	10	9
143	W.	72	92	107	20	15
144	J.	85	96	106	11	10
145	S.	79	96	108	17	12
146	L. S.	86	100	110	14	10

Die Tabelle I umfaßt 146 Untersuchungen von Filtraten des Mageninhalts nach Ewalds Probefrühstück bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten, und sie zeigen alle, wie es aus den beiden letzten Kolumnen ersichtlich ist, daß die erwähnten Differenzen annähernd gleich groß sind. Der Unterschied zwischen den Differenzen überschreitet nur in einem Fall (Nr. 40) den Maximalfehler für dieses Verhältnis, den man zu 8 schätzen muß, wenn man für jede der drei Titrierungen mit dem maximalen Versuchsfehler 2 rechnet. Die Richtung der Abweichung ist verschieden; zuweilen ist die Differenz zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahlen größer, zuweilen kleiner als die Differenz zwischen Günzburg- und Kongo-Zahl; jedoch scheint letzteres das häufigere zu sein, ein Verhalten, das bei den späteren Verdauungsversuchen seine Erklärung finden wird.

Tabelle II.
Reiner Magensaft.

Nr.	Name	G.	K.	Ph.	K. — G.	Ph. — K.
1	M. S.	25	30	38	5	8
2	E. H.	31	39	46	8	7
3	M. P.	38	42	47	4	5
4	A. H.	33	44	51	11	7
5	P. H.	33	45	55	12	10
6	A. T.	45	52	59	7	7
7	A. H.	43	54	62	11	8
8	N. N.	53	60	67	7	7
9	A. F.	58	64	71	6	7
10	L. P.	58	67	75	9	8
11	N. N.	62	68	76	6	8
12	N. N.	59	71	80	12	9
13	L. P.	65	74	82	9	8
14	A. H.	77	83	89	6	6
15	H. H.	77	83	88	6	5
16	A. H.	83	88	94	5	6

In der Tabelle II finden sich Titrierungen von reinem Magensaft verschiedener Patienten mit Hypersekretion; auch hier erscheinen die gleich großen Differenzen ganz wie bei Ewalds Probefrühstück. Daß die Differenzen hier durchschnittlich geringer sind als bei diesem, muß man wahrscheinlich der geringeren Menge von Peptonen zuschreiben.

Im Gegensatz hierzu stehen die Titrierungen der folgenden Tabelle III, die sich auf Mageninhalt nach Fleischmahlzeiten

beziehen, und wo man daher recht große Differenzen findet, die indessen auch von derselben gegenseitigen Größe sind.

Tabelle III.

Filtrate von Mageninhalt nach verschiedenen Fleischmahlzeiten.

Nr.	Name	Mahlzeit	Aufgehoben nach Std.	G.	K.	Ph.	K.—G.	Ph.—K.
1	J. A.	Bourget-Fabers Pr.	8	— 17	16	48	33	32
2	J. C.	—	1	— 11	19	44	30	25
3	E. B.	250 ccm Bouillon, 100 g Fleisch, 2 Stück Weißbrot	2	— 24	30	90	54	60
4	A. J.	Bourget-Fabers Pr.	3	0	31	59		
5	J. N.	250 g Hafersuppe, 100 g Fleisch, 4 Stück Weißbrot	2	8	41	67	33	26
6	J. C.	Bourget-Fabers Pr.	2	23	46	72	23	26
7	E. B.	250 g Bouillon, 100 g Fleisch, 2 Stück Weißbrot	3	— 21	54	132	75	78
8	K.	Bourget-Fabers Pr.	5	31	56	85	25	29
9	M. P.	—	8	37	58	78	21	20
10	M. O.	—	5	46	59	76	13	17
11	O. O.	250 g Hafersuppe, 50 g Fleisch, 4 Stück Weißbrot	$3^1/_2$	36	64	91	28	27
12	E. B.	250 g Bouillon, 50 g Fleisch, 2 Stück Weißbrot	3	— 12	65	135	77	70
13	A. B.	250 g Bouillon, 100 g Fleisch	2	— 15	65	140	80	75
14	M. P.	Bourget-Fabers Pr.	5	58	69	78	11	9
15	J. H.	—	5	20	75	125	55	50
16	E. G.	250 g Milch, 100 g Fleisch, 2 Stück Weißbrot	$2^1/_2$	71	91	117	20	26
17	B. N.	250 g Hafersuppe, 100 g Fleisch, 2 Stück Weißbrot	3	13	100	190	87	90

Die angeführten drei Tabellen zeigen, daß die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahlen ungefähr ebenso groß ist wie die Differenz zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahl, sowohl bei reinem Magensaft wie auch bei Mageninhalten nach verschiedenen Mahlzeiten.

Dieses Verhältnis ist von theoretischem Interesse und hat zu einigen später zu erwähnenden Versuchen Anlaß gegeben;

es hat aber auch eine praktische Bedeutung, die erst besprochen werden soll.

In den meisten Kliniken wird nämlich mit Kongopapier und Phenolphthalein titriert, und diese Zahlen kann man mittels der gleich großen Differenzen zu einer einfachen Berechnung der Menge der freien Salzsäure benutzen, obgleich keine von ihnen an sich zuverlässige Ausdrücke für die Acidität gibt. Ist z. B. die Kongo-Zahl eines Mageninhaltes 30, die Phenolphthalein-Zahl 40, so ist die Differenz dieser Zahlen 10, und zieht man diese Zahl von der Kongo-Zahl 30 ab, so erhält man die Zahl 20, die also die berechnete Günzburg-Zahl ist und die Menge freier Salzsäure bedeutet. Ist in einem anderen Beispiel die Kongo-Zahl dieselbe, nämlich 30, die Phenolphthalein-Zahl aber größer, so ist die Günzburg-Zahl entsprechend kleiner; zwei Mageninhalte mit derselben Kongo-Zahl können somit in bezug auf freie Salzsäure höchst verschieden sein, was aus den Tabellen I bis III, die nach der Größe der Kongo-Zahl geordnet sind, erhellt.

In der Literatur finden sich nur sehr wenige vergleichende Titrierungen mit Kongo, Phenolphthalein und Günzburgs Reagens als Indicatoren. Die meisten Verfasser geben an, daß Kongo und Günzburgs Reagens beinahe dieselben Zahlen geben, wenn Milchsäure nicht zugegen ist.

Eine größere Menge Untersuchungen findet man nur in einer Dissertation von V. Grospietsch[1]), die 100 Titrierungen des Mageninhalts gesunder Menschen umfaßt. Die Durchschnittszahl ist für Günzburgs Reagens 21, für Kongopapier 25, für Phenolphthalein 47. Die durchschnittliche Differenz zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahlen ist somit 22, während die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahlen nur 4 ist. Dieses stimmt also gar nicht mit meinen Versuchen. Die von Grospietsch verwendete Probemahlzeit waren 50 g Zwieback und 250 g russischer Tee, während das von mir verwendete Ewaldsche Probefrühstück 35 g Zwieback und 250 g Wasser waren. Man kann also den Unterschied der Resultate diesen kleinen Verschiedenheiten der Probemahlzeit kaum zuschreiben. Es ist wahrscheinlicher zu vermuten, daß es sich um technische

[1]) V. Grospietsch, Inaug.-Dissert. Breslau 1902.

Verschiedenheiten, namentlich bei den Kongo- und Phenolphthalein-Titrierungen, handelt. Leider fehlen genaue Angaben über das Verfahren des Verfassers bei diesen Titrierungen. Jedenfalls kann man hiervon lernen, daß man nicht ohne weiteres aus den in der Literatur vorkommenden Kongo- und Phenolphthalein-Titrierungen die Menge freier Salzsäure berechnen kann, wenn man nicht mit der verwendeten Technik genau bekannt ist; hat der betreffende Verfasser mit verblichenem Kongopapier und mit Phenolphthalein bis zu stark roter Farbe titriert, so werden diese Zahlen zu niedrig bzw. zu hoch, und die Fehler der Differenzbestimmung werden somit sehr groß.

Ist Milchsäure zugegen, so wird das Verhältnis zwischen den Indicatoren bedeutend verschoben, da diese Säure mit dem Günzburgschen Reagens keine Reaktion gibt, wogegen sie die Kongo- und Phenolphthalein-Zahlen stark beeinflußt. Diese Fehlerquelle spielt indessen keine große Rolle, weil Milchsäure im Mageninhalt mit freier Salzsäure zusammen praktisch genommen nie vorkommt.

Die Titrierungen der Tabellen I bis III sind alle an Filtraten vorgenommen. Bei Titrierung unfiltrierten Mageninhalts findet man in bezug auf Günzburgs Reagens und Kongo gewöhnlich dieselben Titrierungszahlen wie bei den entsprechenden Filtraten. Nur sind die Phenolphthalein-Zahlen oft bei dem unfiltrierten Mageninhalt etwas größer, und man kann also hier die gleich großen Differenzen zur Bestimmung freier Salzsäure nicht benutzen.

Hinsichtlich der theoretischen Bedeutung der gleich großen Differenzen ist die nächstliegende Frage diese: Welcher Stoff im Mageninhalt ist die Ursache dieser Erscheinung? Handelt es sich um Proteinstoffe — und solchenfalls um welche Gruppe von diesen — oder um Aminosäuren, Salze, Zucker usw.?

Bei Titrierungen von Lösungen der verschiedenen Stoffe, die in Betracht kommen könnten, zeigte es sich, daß nur salzsaure Lösungen von Wittepepton (bekanntlich aus Albumosen bestehend) das regelmäßige Verhältnis zwischen den Titrierungszahlen der Indicatoren darboten; die meisten anderen Stoffe zeigten entweder fast gar keine Differenz der Titrierungszahlen (Natriumchlorid, Ammoniumchlorid, Zucker usw.), oder die

Differenz zwischen Günzburg- und Kongo-Zahl war sehr groß, die zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahl sehr klein (Aminosäuren), oder es war das umgekehrte Verhältnis vorhanden, wie bei den Phosphaten, wo die Differenz zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahl ungefähr doppelt so groß wie die zwischen Kongo- und Günzburg-Zahl war. Die wesentlichste Quelle der Differenz zwischen den Titrierungszahlen mußten also die Proteinstoffe sein. Bei Titrierung von genuinen Proteinstoffen findet man indes ein ganz anderes Verhältnis (wenigstens wenn sie durch Dialyse von Salzen gereinigt sind), wie man es aus den folgenden Titrierungen ersieht:

	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Ph.—K.
10 ccm dialysiertes Eiereiweiß	—26	—2	+3	+4	24	6
Serum	—34	—2	+3	+6	32	8

(Die negativen Zahlen bedeuten, daß mit $^{n}/_{10}$-HCl titriert wird.)

Hiermit stimmt überein, daß bei Titrierungen von Mageninhalten bei vollständiger Achylie die gleich großen Differenzen nicht vorhanden waren; erst wenn Pepsin oder Salzsäure, wenn auch nur spurenweise, auftreten, erscheint auch eine größere oder kleinere Annäherung zum erwähnten Verhältnis der Indicatoren. Untersucht man dagegen Proteinstoffe, die außerhalb des Organismus längere Zeit hindurch einer stark peptischen Verdauung unterworfen wurden, dann findet man wieder, wie bei genuinen Proteinstoffen, eine große Differenz zwischen Günzburg- und Kongo-Zahl, eine geringere zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahl, und in ähnlicher Weise verhalten sich trypsinverdaute Proteinstoffe.

Die gleich großen Differenzen sind somit kein Merkmal für Proteinstoffe überhaupt, sondern nur für pepsinverdauten Proteinstoff in den ersten Stadien der Verdauung, also eben im Zeitraum der natürlichen Magenverdauung.

Um nun herauszufinden, wie sich diese verschiedenen Titrierungstypen während der Verdauung ändern, wurden peptische Mischungen verschiedener Art bei 37° in den Thermostaten gestellt und von Zeit zu Zeit mit Günzburgs Reagens, Kongo, Lackmus und Phenolphthalein als Indicatoren titriert.

Da das größte Interesse in klinischer Beziehung sich an Ewalds Probefrühstück knüpft, war es naheliegend, zuerst Mageninhalte nach dieser Mahlzeit zu untersuchen. Die Proben sind alle vor der Titrierung filtriert.

1. Versuch.

Mageninhalt, 1 Stunde nach Ewalds Probefrühstück gewonnen und unfiltriert in den Thermostaten gesetzt.

Titrierung	G.	K.	Ph.
Gleich	34	51	70
Nach 4 Stunden	28	51	76
„ 1 Tage	24	50	77
„ 3 Tagen	21	51	80
„ 16 „	9	51	86

2. Versuch.

Mageninhalt 1 Stunde nach Ewalds Probefrühstück gewonnen, unfiltriert in den Thermostaten gesetzt. (Toluol ist zugesetzt, weil freie Salzsäure fehlt.)

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	0	17	28	35
Nach 4 Stunden	−2	19	29	38
„ 1 Tage	−7	19	29	40

3. Versuch.

Mageninhalt, 1 Stunde nach Ewalds Probefrühstück herausgepumpt und unfiltriert in den Thermostaten gesetzt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	45	57	64	69
Nach 3 Stunden	38	57	64	70
„ 1 Tage	38	57	64	70
„ 10 Tagen	30	58	65	74
„ 42 „	19	56	65	75

4. Versuch.

Zu dem Mageninhalt, 1 Stunde nach Ewalds Probefrühstück gewonnen, wird ein wenig normale Salzsäure zugesetzt, und das Ganze wird darauf in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	130	151	161	168
Nach 4 Stunden	129	152	162	172
„ 1 Tage	125	151	164	175
„ 8 Tagen	110	152	166	181
„ 45 „	95	152	170	187

5. Versuch.

Ein heraufgepumptes „trockenes“ Ewalds Probefrühstück (d. h. der Patient hat nur 35 g Zwieback, kein Wasser bekommen) wird unfiltriert in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	28	52	61	70
Nach 1 Tage	24	51	62	72
„ 6 Tagen	17	51	62	71
„ 26 „	5	51	65	78
„ 70 „	− 2	50	65	79

6. Versuch.

Ein Zwieback (35 g) wird gekaut und darauf wieder aus dem Munde gegeben; er hat dabei 23 g an Gewicht zugenommen. Nun wird er mit 70 ccm reinem Magensaft und 70 ccm $^{n}/_{5}$-HCl gemischt und unfiltriert in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	82	101	111	115
Nach 4 Stunden	69	102	116	129
„ 1 Tage	65	101	117	131
„ 15 Tagen	31	101	120	147

7. Versuch.

Mageninhalt, 1 Stunde nach Ewalds Probefrühstück herausgepumpt, wird filtriert und in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	14	32	42	49
Nach 4 Stunden	14	32	42	49
„ 2 Tagen	11	31	42	49
„ 15 „	4	32	42	52
„ 30 „	0	32	42	53
„ 75 „	− 7	32	43	53

Es geht aus diesen sieben Zwiebackversuchen hervor, daß die Indicatoren, während des Vorwärtsschreitens der Pepsinverdauung, sich auf höchst verschiedene Weise verhalten: Die Günzburg-Zahl nimmt zu und die Kongo- und Lackmus-Zahlen bleiben ungefähr konstant. Die größte Veränderung geschieht am ersten Tag; während dieses Zeitraumes ändern sich die Günzburg- und Phenolphthalein-Zahlen ungefähr gleich viel, weshalb deren Abweichungen von der Kongo-Zahl, die gleich bleibt, auch gleich groß sind. Bei weiterem Stehenlassen ändern sich die Titrierungszahlen viel langsamer als am ersten

Tag, und zwar die Phenolphthalein-Zahl etwas langsamer als die Günzburg-Zahl; die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahl wird daher am Ende der Pepsinverdauung bedeutend sein, größer als die Differenz zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahl. Eine solche langdauernde Pepsinverdauung findet aber unter natürlichen Verhältnissen im menschlichen Magen nicht statt, und man findet daher im Mageninhalt, praktisch genommen, immer gleich große Differenzen zwischen den Titrierungszahlen mit Günzburgs Reagens, Kongo und Phenolphthalein.

Der 7. Versuch betrifft, im Gegensatz zu den übrigen, filtrierten Mageninhalt. Es zeigt sich hier die Eigentümlichkeit, daß die Phenolphthalein-Zahl nur sehr wenig ansteigt, und daß die Lackmus-Zahl, gleich wie im folgenden Versuch 8, ganz unverändert bleibt, während sie in den Versuchen 1 bis 6 stets in — zwar sehr langsamem — Zunehmen begriffen war. Die Kongo-Zahl bleibt dagegen sowohl in filtriertem wie auch in unfiltriertem Mageninhalt während der Zwiebacksverdauung ganz unverändert.

Die folgenden Versuche 8 und 9 sind an rohem und dialysiertem Eiweiß angestellt; sie zeigen etwa dieselben Verhältnisse wie die Zwiebackversuche.

8. Versuch.

Zu einer salzsauren Lösung von rohem Hühnereiweiß wird reiner Magensaft (gleiche Teile) gesetzt und die Mischung in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	43	60	73	75
Nach $2^1/_2$ Stunden	32	58	73	81
„ 1 Tage	22	59	74	85
„ 4 Tagen	19	58	72	85
„ 40 „	7	59	73	90

9. Versuch.

50 ccm dialysiertes Eiweiß werden mit 50 ccm $1^0/_0$ igem Parke-Davis-Pepsin in $^n/_{10}$-HCl gelöst und in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	Ph.
Gleich	24	47	59
Nach 1 Tage	12	46	68
„ 4 Tagen	8	46	69
„ 12 „	6	46	69

In diesem letzteren Versuche wie auch in einigen von den folgenden sind künstliche Pepsinlösungen verwendet worden. Es ist daher von Interesse zu wissen, wie sich Parke-Davis-Pepsin in titrimetrischer Beziehung verhält, wenn salzsaure Lösungen davon ohne einigen Zusatz in den Thermostaten gestellt werden.

10. Versuch.

Ca. 4%iges Parke-Davis-Pepsin, in $^{n}/_{10}$-HCl gelöst und filtriert, wird in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	40	120	139	159
Nach 1 Tage	39	120	139	159
„ 60 Tagen	14	120	138	170

11. Versuch.

Die obenstehende Lösung, mit 0,04 n-HCl (Titrierungszahl 40) im Verhältnis 1:4 verdünnt (also ca. 1%iges Parke-Davis-Pepsin), wird in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.
Gleich	39	59	66	69
Nach 1 Tage	39	59	66	69
„ 60 Tagen	34	59	65	70

Die beiden letzten Versuche zeigen, daß Parke-Davis-Pepsin in salzsauren Lösungen zwar Änderungen der Titrierungszahlen erkennen läßt, aber nur bei langer Versuchszeit und starker Konzentration. Bei den gewöhnlich verwendeten Konzentrationen (ca. $^{1}/_{2}$%) spielen somit diese kleinen Verschiebungen keine große Rolle für die Beurteilung der Versuche.

In der Literatur finden sich nur wenige und zerstreute Versuche ähnlicher Art; sie sind aber mit den hier angeführten in vollkommener Übereinstimmung. So hat Bourget[1]) schon 1889 gezeigt, daß die Günzburgsche Reaktion (qualitativ ausgeführt) während der Verdauung immer schwächer wird und zuletzt ganz verschwindet. Auch Ambard und Foà[2]) elektrometrische und titrimetrische Versuche (1905) müssen hier erwähnt werden; diese Verfasser titrierten zwar nicht mit Günzburgs Reagens, sondern sie nahmen elektrometrische Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentrationen vor, die ja, wie früher gezeigt, mit den Günzburg-Zahlen sehr gut verglichen werden können. Als Substrat benutzten sie dialysiertes Eiweiß, das mit Hundemagensaft in dem Thermo-

[1]) Bourget, Arch. de méd. experim., 1. Serie, 1, 844, 1889.

[2]) Ambard et Foà, Compt. rend. Soc. Biol. 2, 5, 1905.

staten verdaut wurde. Von Zeit zu Zeit wurden Proben genommen, teils zur Bestimmung der Totalacidität mittels Titrierung mit Phenolphthalein, teils zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration. Es wurden drei Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen ausgeführt und die Resultate waren die folgenden (die Wasserstoffionenkonzentrationen sind in Titrierungszahlen freier Salzsäure umgerechnet, um sie mit den Günzburg-Zahlen vergleichen zu können). Im ersten Versuche änderte sich die Menge freier Salzsäure von 27 bis 14, während die Phenolphthalein-Zahl von 51 bis 61 in der Zeit von 5 Stunden zunahm; im 2. Versuch ging die Zahl der freien Salzsäure von 21 bis 11, die Phenolphthalein-Zahl von 47 bis 57, und im 3. Versuch ging die Zahl der freien Salzsäure von 26 bis 12, die Phenolphthalein-Zahl von 47 bis 58. Diese Versuchsreihen sind also mit den meinigen ganz analog, indem sie ein deutliches Zunehmen der Phenolphthalein-Zahlen und Abnehmen der Wasserstoffionenkonzentration während der peptischen Verdauung zeigen, und diese abnehmende Wasserstoffionenkonzentration findet durch die gleichzeitig abnehmende Menge freier Salzsäure (die Günzburg-Zahlen) ihre natürliche Erklärung.

Das Zunehmen der Phenolphthalein-Zahlen ist später (1908) von S. P. L. Sörensen[1]) bei Verdauungsversuchen mit rohem Hühnereiweiß bestätigt worden.

Um diese verschiedenen titrimetrischen Verhältnisse näher zu verstehen, und namentlich um zu wissen, wie die Bindung freier Salzsäure während der Verdauung geschieht, war es wünschenswert, auch mit anderen Methoden den Verlauf der Verdauung verfolgen zu können.

Auf Rat Prof. S. P. L. Sörensens wurde zu diesem Zwecke die von ihm ausgearbeitete Methode zur Bestimmung der Menge von Aminogruppen, die Formoltitrierung[1]), gewählt.

Bei dieser Methode wird eine Bestimmung der reaktionsfähigen Aminogruppen, oder, was dasselbe bleibt, eine Bestimmung der mit diesen Aminogruppen (NH_2) äquivalenten Säuregruppen (COOH) erstrebt. Bei Zusatz von Formol zu einer Lösung, die solche Gruppen enthält, entsteht eine Verbindung zwischen Formol und NH_2, und die gebildeten Methylenverbindungen $—N{=}CH_2$ reagieren neutral. Die Säuregruppen werden somit frei und können wie andere schwache Säuren mit NaOH, bis eine stark rote Farbe mit Phenolphthalein erreicht wird, titriert werden. Der Prozeß geht folgendermaßen vor sich:

$$R\langle{}^{NH_2}_{COOH} + HCOH = R\langle{}^{N=CH_2}_{COOH} + H_2O.$$

$R\langle{}^{NH_2}_{COOH}$ ist der schematische Ausdruck einer Aminosäure, die in die Gruppe der amphoteren Stoffe gehört, wozu die Proteinstoffe und

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 7, 45, 1908.

deren Abbauprodukte bekanntlich gezählt werden müssen. Diese sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sowohl saure (COOH) wie auch basische Gruppen enthalten. Diese Gruppen neutralisieren einander gegenseitig, und die Reaktion ist somit weder sauer noch alkalisch, sondern beinahe neutral. Erst wenn Formol zugesetzt wird, werden die sauren Eigenschaften der COOH-Gruppen freigemacht, und die Lösung wird stark sauer.

Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in der Originalarbeit Sörensens und soll daher hier unterbleiben. Es sei nur erwähnt, daß man zur Formoltitrierung 20 ccm der neutralisierten Lösung verbraucht, dazu neutralisiertes Formol setzt und mit $^{n}/_{5}$-NaOH, bis eine starke rote Farbe mit Phenolphthalein erreicht ist, titriert. Die Zahlen, in $^{1}/_{10}$ ccm NaOH angegeben, kann man somit mit den Titrierungszahlen (wo man ja 10 ccm der Lösung und $^{n}/_{10}$-NaOH benutzt) direkt vergleichen.

Der Zweck der folgenden Versuche ist, wie erwähnt, die peptische Spaltung der Eiweißstoffe sowohl mittels Titrierung wie auch mittels Formoltitrierung zu verfolgen. Daß die Formoltitrierung hierzu verwendbar ist, ist von S. P. L. Sörensen erwiesen. Der wesentlichste Teil des Proteinstoffmoleküls ist ja, wie dieser Verfasser es ausdrückt, aus Aminosäuren aufgebaut, indem diese durch Anhydridbildung zwischen Carboxyl- und Aminogruppen miteinander verknüpft sind („Peptidbindungen"). Nun muß man nach E. Fischers Untersuchungen die proteolytische Spaltung als eine Hydrolyse — eine Spaltung dieser Peptidbindungen — unter Bildung von Carboxyl- und Aminogruppen auffassen; eine rationelle Methode zur quantitativen Bestimmung des Umfanges der Proteolyse muß also darauf abzielen, die Menge der während der Proteolyse gebildeten Carboxyl- oder Aminogruppen zu messen, wie es ja eben die Formoltitrierung beabsichtigt.

Hinsichtlich der Titrierungen konnte man sich denken, daß die gebildeten Aminogruppen Salzsäure binden, ganz wie Ammoniak mit Salzsäure Ammoniumchlorid bildet, und das Abnehmen der Günzburg-Zahlen während der Verdauung konnte hierdurch seine Erklärung finden. Die folgenden Versuche bestätigen vollkommen diese Vermutung, indem die abnehmenden Günzburg-Zahlen und die zunehmenden Formoltitrierungszahlen die schönste gegenseitige Übereinstimmung zeigen.

In den Versuchen 12 und 13 ist als Substrat Weizengluten benutzt worden, da dieses den Hauptteil des Proteinstoffes des Zwiebacks ausmacht.

12. Versuch.

100 ccm 1%iges Gluten in $^{n}/_{10}$-HCl + 50 ccm 1%iges Parke-Davis-Pepsin in $^{n}/_{10}$-HCl werden in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Gleich	88	96	104	105	8	6
Nach 4 Tagen	84	95	104	106	11	12
„ 12 „	77	94	104	105	17	17

13. Versuch.

50 ccm gesättigte salzsaure Glutenlösung + 50 ccm 1%iges Parke-Davis-Pepsin in $^{n}/_{10}$-HCl werden in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Gleich	91	104	112	115	13	13
Nach 7 Tagen	84	104	112	116	20	21

Diese Versuche zeigen, wie erwartet, eine gute Übereinstimmung zwischen den Veränderungen der Günzburg-Zahlen und der Formoltitrierungs-Zahlen. Im Versuche 12 nimmt die Günzburg-Zahl im Verlaufe von 12 Tagen von 88 bis 77, also 11 ab, während die Formoltitrierungs-Zahlen im selben Zeitraum von 6 bis 17, also auch 11, zunimmt. Im 13. Versuche ist das Abnehmen der Günzburg-Zahl 7, und das Zunehmen der Formoltitrierungs-Zahl etwa dasselbe, nämlich 8. Außer dieser, im voraus erwarteten Übereinstimmung zeigen die Versuche ein zweites eigentümliches Verhältnis. **Die Differenzen zwischen Kongo- und Günzburg-Zahlen sind**, wie es aus der Betrachtung der 5. und 6. Kolonne erhellt, **beinahe ebenso groß wie die entsprechenden Formoltitrierungs-Zahlen.**

Dasselbe ersieht man aus den folgenden Versuchen, wo die Verdauung von Hühnereiweiß und Serum untersucht ist.

14. Versuch.

70 ccm dialysiertes Eiweiß + 30 ccm 1%iges Parke-Davis-Pepsin in $^{n}/_{10}$-HCl + 2 ccm 5 n-HCl werden in den Thermostaten gebracht.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	97	124	132	138	27	20
Nach 1 Tage	81	117	133	146	36	35
„ 7 Tagen	71	117	133	149	46	44

15. Versuch.

50 ccm dialysiertes Eiweiß + 50 ccm 1 %iges Parke-Davis-Pepsin + 25 ccm $^{n}/_{10}$-HCl + 25 ccm Wasser, im Thermostaten.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	30	46	55	58	16	14
Nach 1 Tage	23	45	55	63	22	21
„ 4 Tagen	20	45	54	64	25	24

16. Versuch.

50 ccm dialysiertes Eiweiß + 50 ccm 1 %iges Parke-Davis-Pepsin + 25 ccm $^{n}/_{2}$-HCl + 25 ccm Wasser, im Thermostaten.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	92	109	120	122	17	13
Nach 1 Tage	85	109	120	126	24	21

17. Versuch.

100 ccm dialysiertes Eiweiß + 50 ccm reiner Magensaft + 10 ccm n-HCl, im Thermostaten.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	61	80	86	88	19	15
Nach 5 Stunden	54	80	86	94	26	24
„ 1 Tage	48	77	86	94	29	27
„ 5 Tagen	47	77	86	96	30	—
„ 32 „	36	77	87	99	41	41

18. Versuch.

50 ccm dialysiertes Serum + 20 ccm ca. 3 %iges Parke-Davis-Pepsin in $^{n}/_{10}$-HCl + 5 ccm n-HCl, im Thermostaten.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	46	90	107	118	44	—
Nach 1 Tage	34	89	107	126	55	56
„ 4 Tagen	28	90	108	128	62	60
„ 40 „	10	89	108	128	79	78

19. Versuch.

70 ccm rohes Kälberserum + 13 ccm n-HCl + 83 ccm reiner Magensaft, im Thermostaten.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.−G.	Formoltitrierung
Sogleich	67	98	121	126	31	28
Nach 2 Tagen	33	92	121	146	59	64
„ 4 „	26	91	121	150	—	—
„ 9 „	21	91	121	150	—	—

In allen diesen Versuchen findet sich eine vollständige Übereinstimmung zwischen der zunehmenden Menge von Aminogruppen (durch die Formoltitrierungs-Zahlen ausgedrückt) und der abnehmenden Menge freier Salzsäure (durch die Günzburg-Zahlen ausgedrückt). In bezug auf den Zusammenhang zwischen den absoluten Formoltitrierungs-Zahlen und den Differenzen (K. — G.) finden sich indes einige Ausnahmen von vollständiger Gleichheit der Zahlen. Diese Ausnahmen scheinen damit zusammenzuhängen, daß die Kongo-Zahl im Beginne der Verdauung von Hühnereiweiß und Serum ein wenig abnimmt, um erst nach einiger Zeit konstant zu werden (siehe namentlich die Versuche 14, 17 und 19). Erst wenn die Kongo-Zahl konstant bleibt, wird die Übereinstimmung zwischen den Formoltitrierungs-Zahlen und den Differenzen (K. — G.) deutlich ausgesprochen. Im Versuche 19, wo es sich um rohes Serum handelt, muß man die Differenzen zwischen den zwei letzten Kolonnen teils dem erwähnten Verhältnis der Kongo-Zahl, teils Verunreinigungen des Substrates zuschreiben. Verschiedene Salze, z. B. Ammoniumchlorid, werden nämlich bei der Formoltitrierung mitbestimmt, während sie auf die gewöhnlichen Titrierungs-Zahlen keinen Einfluß haben.

Bezüglich möglicher Verunreinigungen des verwendeten Pepsins, die die Zahlen beeinflussen könnten, soll der folgende Versuch Aufschluß geben.

20. Versuch.

Ca. 2%iges Parke-Davis-Pepsin in salzsaurer Lösung wird in den Thermostaten gestellt.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.−G.	Formoltitrierung
Sogleich	40	80	90	99	40	32
Nach 1 Tage	40	80	90	99	40	32
„ 60 Tagen	26	79	90	100	53	44

Die Zahlen der letzten zwei Kolonnen zeigen zwar einigen Unterschied, nämlich 8 bis 9; die in diesem Versuche verwendete Konzentration ist indes etwa 4 mal größer als die in den Versuchen 14 bis 18 verwendete, und der hiervon stammende Fehler kann also nicht größer als 2 sein.

Die erwähnte Änderung der Kongo-Zahl im Beginne der Verdauung ist nicht groß und kann nur bei starken Konzentrationen des Eiweißes nachgewiesen werden; sie ist jedoch unzweifelhaft und wird dadurch bestätigt, daß die Formoltitrierungs-Zahl bei genuinen Proteinstoffen etwas kleiner ist als die Differenz K. — G. (bei dialysiertem Hühnereiweiß z. B. ist die Formoltitrierungs-Zahl 19, die Differenz K. — G. 24), ganz wie im Beginne der peptischen Verdauung derselben Stoffe. Es muß also im Beginne der Proteolyse eine eigentümliche Änderung der Moleküle stattfinden, die dadurch ihren Ausdruck findet, daß die Kongo-Zahl kleiner wird, und erst danach erscheint die Übereinstimmung zwischen der Formoltitrierungs-Zahl und K. — G., die für Albumosen und Peptone, nicht aber für genuines Eiweiß charakteristisch ist.

Die Lackmus-Zahl ist in den Versuchen 14 bis 19, die ja allen gelösten Proteinstoff betreffen, ganz unverändert. Im Gegensatz hierzu zeigen Versuche mit suspendiertem Eiweiß ein stetes Zunehmen der Lackmus-Zahl, wie man aus dem folgenden Versuch 21, wie auch aus den früheren Zwiebackversuchen (1 bis 6) ersieht.

21. Versuch.

10 g Fibrin werden mit 500 ccm 0,4%igem Pepsin Armour in $^{n}/_{10}$-HCl geschüttelt und die Suspension in den Thermostaten gebracht.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formoltitrierung
Sogleich	72	88	99	105	16	18
Nach 2 Stunden	64	86	100	109	22	25
„ 1 Tage	56	86	102	113	30	32
„ 60 Tagen	29	89	103	122	60	58
„ 135 „	20	88	103	125	68	67

Dieser Versuch zeigt übrigens in sehr instruktiver Weise die vielfach erwähnten Verhältnisse zwischen Günzburg-Zahlen, Formoltritrierungs-Zahlen und K. — G.

Der folgende Versuch 22 ist mit einer Lösung von Wittepepton angestellt, um zu untersuchen, ob dieses Präparat für weitere Pepsinverdauung zugänglich sei.

22. Versuch.

50 ccm 4%ige Witte-Peptonlösung + 50 ccm 1%iges Parke-Davis-Pepsin in $^{n}/_{10}$-HCl + 25 ccm $^{n}/_{10}$-HCl + 25 ccm Wasser im Thermostaten gehalten.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	15	38	52	59	23	24
Nach 2 Tagen	9	37	52	62	28	29
„ 9 „	—1	29	44	56	30	42

Es erhellt aus diesem Versuche, daß Wittepepton nicht fertig verdaut ist, was im voraus wahrscheinlich war, da es ja wesentlich Albumosen enthält. Die Untersuchungen nach 2 Tagen zeigen dieselben Verhältnisse wie bei den früheren Versuchen, dagegen fallen die Zahlen nach 9 Tagen ganz heraus; die Ursache hiervon war wahrscheinlich die wegen Fehlens freier Salzsäure schnell eintretende Fäulnis der Lösung, die durch stinkenden Geruch und Mißfärbung leicht zu erkennen war.

Um diese Erklärung sicher zu stellen, wurde der folgende Versuch vorgenommen; die Mengenverhältnisse von Pepton und Pepsin sind ganz dieselben, nur die Salzsäuremenge ist größer.

23. Versuch.

50 ccm 4%ige Witte-Peptonlösung + 50 ccm 1%iges Parke-Davis-Pepsin + 25 ccm $^{n}/_{2}$-HCl + 25 ccm Wasser werden in den Thermostaten gebracht.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formol-titrierung
Sogleich	80	105	118	127	25	24
Nach 2 Tagen	76	105	118	129	29	30
„ 9 „	69	105	118	129	36	37

In diesem Versuche ist wegen der antiseptischen freien Salzsäure kein Zeichen der Fäulnis vorhanden, und die Verhältnisse bei Titrierung und Formoltitrierung sind daher die gewöhnlichen.

Die wichtigsten Resultate, die den angestellten Versuchen entnommen werden können, sind die folgenden:

I. Die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahl ist im Beginne der peptischen Verdauung der Differenz zwischen Kongo- und Phenolphthalein-Zahl gleich zu setzen. Dieses Verhältnis findet sich, praktisch genommen, immer im menschlichen Mageninhalt.

II. Die Menge freier Salzsäure, mittels des Günzburgschen Reagens gemessen, nimmt während der peptischen Verdauung ab und ist als die Ursache der gleichzeitig abnehmenden Wasserstoffionenkonzentration anzusehen.

III. Das Abnehmen der Günzburg-Zahl ist von derselben Größe wie das gleichzeitige Zunehmen der Formoltitrierungs-Zahlen und muß also von der Bindung der Salzsäure an die während der Verdauung allmählich neu gebildeten Aminogruppen herrühren.

IV. Die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahlen ist (mit wenigen Ausnahmen) von derselben Größe wie die Formoltitrierungs-Zahlen. Das Natriumhydroxyd, das zwischen Günzburg- und Kongo-Umschlag zugesetzt wird, wird also wahrscheinlich zur Abspaltung und Sättigung der an den Aminogruppen gebundenen Salzsäure verbraucht.

Untersuchungen über freie und gebundene Salzsäure im Mageninhalt.

III. Mitteilung.

Titrimetrische Untersuchungen über die Pankreatin-Erepsinverdauung und über Aminosäuren und Polypeptide.

Von

Johanne Christiansen.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

A. Titrimetrische Untersuchungen über die Pankreatin-Erepsinverdauung.

Die Pankreatin-Erepsinverdauung besteht wie die Pepsinverdauung in einer Spaltung von Peptidbindungen der Eiweißmoleküle, derart, daß mehrere reaktionsfähige formoltitrierbare Aminogruppen entstehen. Nichtsdestoweniger muß ein Wesensunterschied zwischen den Angriffsweisen dieser verschiedenen Enzyme bestehen, denn die Pepsinverdauung kann nicht, oder doch nur in ganz geringem Grade, auch bei lange dauernder Einwirkung unter den günstigsten Bedingungen, das Eiweiß bis zu freien Aminosäuren abbauen, wie es bei der Pankreatin-Erepsinverdauung geschieht. Man weiß noch nicht, worauf dieser Unterschied beruht, und auch die folgenden Untersuchungen können dafür keine Erklärung geben; sie wurden auf Rat S. P. L. Sörensens vorgenommen, um nachzuweisen welche Einwirkung auf die Titrierungszahlen die vollständige Spaltung der Proteinstoffe hat.

Um eine möglichst große Spaltung zu erzeugen, wurde eine Mischung von frisch zubereitetem Pankreatin und Erepsin benutzt; diese Lösung wurde von Pankreas und Därmen eines kurz vorher getöteten Hundes nach den Angaben O. Cohnheims[1]) hergestellt.

[1]) O. Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 451, 1901.

Das Substrat war im Versuch 3 Witte-Pepton, in den beiden ersten Versuchen pepsinverdautes Fleischalbumin, nach Cohnheims Anweisung zubereitet.

Die Technik der drei Versuche ist die folgende: Nachdem die Enzymlösung und das Substrat zusammengemischt sind, wird eine Probe genommen, mit einem Überschuß von Salzsäure versetzt, worauf sie der Titrierung und Formoltitrierung unterworfen werden. Die Mischung wird danach mit Toluol und Chloroform, um Fäulnis zu vermeiden, versetzt und in den Thermostaten zur Verdauung gestellt. Von Zeit zu Zeit werden Proben entnommen, mit derselben Menge Salzsäure versetzt und darauf titriert und formoltitriert. Der Zusatz von Salzsäure geschieht, um mit den Versuchen der vorhergehenden Mitteilung vergleichbare Zahlen zu bekommen. Die Reaktion, bei der die Versuche angestellt wurden, war in der Nähe des Umschlagspunktes des Phenolphthaleins gelegen, also schwach alkalisch, und eventuelle Änderungen dieser Reaktion während der Verdauung wurden dadurch nachgewiesen, daß 3 Tropfen 1%iger Phenolphthaleinlösung zu 5 ccm der herausgenommenen Proben zugesetzt wurden; die Farbenänderungen sind in der letzten Kolonne der untenstehenden Versuche aufgeführt worden.

1. Versuch.

250 ccm von der Lösung pepsinverdautes Fleischalbumin + 100 ccm n-NaOH + 50 ccm Pankreatin-Erepsinlösung + 100 ccm Wasser werden zusammengemischt und bei 37° in den Thermostaten gestellt. Die Lösung ist unklar, wird stark rot mit Phenolphthalein, enthält 0,58% Stickstoff. Einer jeden der Proben werden 3 Teile $^{n}/_{5}$-HCl zugesetzt; die Titrierung und Formoltitrierung geschieht also in der Verdünnung 1 : 4.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	Formoltitrierung	Reakt. m. Phenolphthalein
sogleich	86	125	131	144	34	stark rot
nach 3 Stunden . . .	ca. 80	125	133	141	45	—
„ 1 Tag	ca. 69	125	133	138	61	—
„ 3 Tagen	65—70	125	133	137	66	—
„ 5 „	65—70	125	134	137	65	—
„ 23 „	65—70	125	135	137	66	—

Die Spaltung war also schon nach 3 Tagen zu Ende. Der formoltitrierbare Stickstoff war dann 64% von dem Totalstickstoff. Bei Säurespaltung wurde ein wenig mehr, nämlich 73,5% des Totalstickstoffs formoltitrierbar.

2. Versuch.

80 ccm der Lösung von pepsinverdautem Fleischalbumin + 136 ccm $^{n}/_{5}$-NaOH + 20 ccm Pankreatin-Erepsin + 264 ccm Wasser werden in den Thermostaten bei 37° gestellt. Die Lösung ist unklar, wird nicht

mit Phenolphthalein gefärbt, enthält 0,21 % Stickstoff. Einer jeden der Proben werden gleiche Teile $^n/_5$-HCl zugesetzt. Die Titrierung und Formoltitrierung geschieht also bei der Verdünnung 1 : 2.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	Formoltitrierung	Reakt. m. Phenolphthalein
sogleich	64	88	91	98	24	ungefärbt
nach 1 Stunde	ca. 63	88	94	99	29	—
„ 4 Stunden . . .	ca. 57	88	94	98	38	—
„ 1 Tag	ca. 49	87	95	96	45	hellrot
„ 3 Tagen	45—50	89	95	96	47	—
„ 15 „	45—50	88	95	96	49	—
„ 30 „	45—50	88	96	96	49	—

Am Ende der Spaltung waren 65 % von dem Totalstickstoff formoltitrierbar geworden. Die Säurespaltung zeigte nur unbedeutend mehr, indem 69 % von dem Gesamtstickstoff hierbei formoltitrierbar wurden.

3. Versuch.

100 ccm 5 %ige Witte-Peptonlösung + 68 ccm $^n/_5$-NaOH + 20 ccm Pankreatin-Erepsin + 284 ccm Wasser werden in den Thermostaten bei 37° gestellt. Die Lösung ist unklar, wird nicht mit Phenolphthalein gefärbt, enthält 0,22 % Stickstoff. Einer jeden der Proben werden gleiche Teile $^n/_5$-HCl zugesetzt. Die Titrierung und Formoltitrierung geschieht also in der Verdünnung 1:2.

Titrierung	G.	K.	L.	Ph.	Formoltitrierung	Reakt. m. Phenolphthalein
sogleich	68	88	94	97	21	ungefärbt
nach 3 Stunden . . .	ca. 60	89	94	98	33	—
„ 1 Tag	ca. 53	89	95	96	46	hellrot
„ 3 Tagen	45—55	89	95	96	46	—
„ 17 „	45—55	89	96	96	50	—

Das Verhältnis nach Säurespaltung war etwa wie bei dem 25. Versuch, indem die weitere Spaltung sehr gering war. In den drei obenstehenden Versuchen sind somit bzw. 87, 92 und 93 % von dem überhaupt spaltbaren Stickstoff während der Verdauung formoltitrierbar geworden.

Der Abbau bei diesen Versuchen war also ein sehr tiefgreifender. Daß hierbei Aminosäuren gebildet sind, erhellt auch ganz deutlich aus den Titrierungszahlen. Die Günzburgzahlen zeigten die Eigentümlichkeit, daß der Umschlagspunkt sehr schwierig zu bestimmen war; derselbe ist deshalb nicht genau angegeben. Diese Schwierigkeit hat ihre Ursache in dem Umstande, daß die Hydrochloride der gebildeten Aminosäuren

stark hydrolysiert sind. Wird nun die hydrolytisch abgespaltene Salzsäure durch den Zusatz einiger Tropfen Natronlauge neutralisiert, so wird gleich eine neue geringe Salzsäuremenge durch die Hydrolyse freigemacht, und man wird deshalb längere Zeit hindurch eine ganz schwache, aber sicher positive Günzburgsche Reaktion erhalten. Daß dies wirklich der Fall ist, werden spätere Titrierungen von reinen Aminosäuren bestätigen.

Auch das eigentümliche Verhältnis der Phenolphthalein-Zahlen und der damit zusammenhängenden Reaktionsänderungen der Lösungen sind der Bildung von Aminosäuren zuzuschreiben. Wie man sich erinnert, war während der Pepsinverdauung die Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthalein-Zahl in beständigem Zunehmen, während der Pankreatin-Erepsinverdauung dagegen wird dieselbe Differenz kleiner, bis schließlich die Zahlen beinahe oder ganz zusammenfallen. Um dies zu verstehen, muß man bedenken, daß die Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthalein-Zahlen bei Aminosäuren sehr klein ist, während sie bei Polypeptiden je nach der Menge der Peptidbindungen größer wird. Dies haben schon Henriques und Sörensen[1]) bei Titrierungen von Glycin und Glycylglycin erwiesen, und es wird bei den später folgenden Titrierungen von anderen reinen Aminosäuren und Polypeptiden bestätigt. Man muß sich also denken, daß während der Pepsinverdauung sich Polypeptide mit mehreren Peptidbindungen bilden, die die große Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthalein-Zahl bedingen, wogegen diese Peptidbindungen bei der Einwirkung des Pankreatin-Erepsins vollständig gespalten werden. Diese Erklärung ist auch von Henriques und Gjaldbäk[2]) benutzt worden, um eine Reihe Versuche ähnlicher Art zu deuten.

In bezug auf die Reaktionsänderungen der Lösungen während der Pankreatin-Erepsinverdauung liegen diese augenscheinlich in der Richtung abnehmender Wasserstoffionenkonzentration, indem die Farbe mit Phenolphthalein (siehe die Versuche 2 und 3) stärker wird; auch dieses Verhältnis steht mit der Bildung freier Aminosäuren in Verbindung, und es ist

---

[1]) V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 27, 1909.

[2]) V. Henriques und J. R. Gjaldbäk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 485, 1911.

nur, wenn die Verdauung stark genug ist, dieselben abzuspalten, der Fall, daß die Reaktionsänderung diese Richtung nimmt. Bei schwächerer Einwirkung geht die Änderung in entgegengesetzter Richtung, wie es z. B. bei einem Versuch von S. P. L. Sörensen [Enzymstudien II, S. 194[1])] stattfand, wo Witte-Pepton von Pankreatin (Rhenania) bei Zimmertemperatur verdaut wurde.

Die Resultate dieser Pankreatin-Erepsinversuche sind die folgenden:

1. Die Titrierungen mit Günzburgs Reagens als Indicator zeigen ein von den Titrierungen peptischer Verdauungslösungen abweichendes Verhältnis, indem der Umschlag nicht genau bestimmt werden kann. Die Ursache hierzu liegt wahrscheinlich in der großen Hydrolyse der bei der Pankreatin-Erepsinverdauung freigemachten Aminosäuren.

2. Die Wasserstoffionenkonzentration wird im Laufe einer starken Pankreatin-Erepsinverdauung nur ganz zu Beginn gegen die saure Seite hin verschoben; sobald aber freie Aminosäuren in beträchtlichem Maße abgespalten werden, nimmt die Wasserstoffionenkonzentrationen wieder ab; dies läßt sich nicht nur colorimetrisch, sondern auch durch Titrierungen nachweisen.

B. Titrimetrische Untersuchungen über Aminosäuren und Polypeptide.

In den vorhergehenden Mitteilungen wurde nachgewiesen, daß die Titrierungen verschiedene Resultate gaben, je nachdem es sich um Pepsinverdauung oder um Pankreatin-Erepsinverdauung handelte, und es wurde wahrscheinlich gemacht, daß die Bildung oder Nichtbildung von freien Aminosäuren das entscheidende Moment war.

In Zusammenhang mit diesen Untersuchungen war es daher natürlich, reine Aminosäuren und Polypeptide zu untersuchen, um herauszufinden, inwieweit tatsächlich ein titrimetrisch nachweisbarer Unterschied zwischen diesen Stoffen besteht.

---

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 181, 1909.

Reine Aminosäuren sind leicht im Handel zu erhalten, von Polypeptiden dagegen ist nur Leucylglycin käuflich, die anderen muß man durch schwierige und umständliche Methoden darstellen. Ich bin daher dem Herrn Prof. Dr. E. Abderhalden zu vielem Danke verpflichtet, weil er mir durch die Vermittlung von Prof. S. P. L. Sörensen einige Polypeptide, nämlich Alanylglycin, Diglycylglycin und Glycyltyrosin überlassen hat. Ein fünftes Polypeptid, nämlich Glycylglycin, habe ich nach Fischers Vorschrift unter der Assistenz des Herrn S. Palitzsch selbst dargestellt.

Die Möglichkeit der synthetischen Darstellung der Polypeptide verdankt man bekanntlich E. Fischer und seinen Mitarbeitern (E. Abderhalden). Das einfachste Beispiel eines solchen Polypeptids gibt die Vereinigung zweier Moleküle der Aminosäure Glycin zu dem Dipeptid Glycylglycin:

$$\underset{\text{Glycin}}{CH_2\left\langle\begin{matrix}NH_2\\COOH\end{matrix}\right.} + \underset{\text{Glycin}}{CH_2\left\langle\begin{matrix}NH_2\\COOH\end{matrix}\right.} = \underset{\text{Glycylglycin}}{CH_2\left\langle\begin{matrix}NH—CO\\COOH\;NH_2\end{matrix}\right\rangle CH_2} + H_2O$$

Das so gebildete Glycylglycin kann man als einen sehr primitiven Proteinstoff betrachten; von diesem ausgehend können mit neuen „Peptidbindungen“ (NH—CO) Polypeptide höherer Ordnung aufgebaut werden, bis sehr hohe Molekülzahlen erreicht sind. Fischer hat tatsächlich bei Benutzung verschiedener Aminosäuren eine große Menge von Polypeptiden von zum Teil sehr verwickelter Zusammensetzung dargestellt, von denen einige den natürlich vorkommenden Proteinstoffen sehr ähnlich sind.

Bei der Verdauung geht der Prozeß in entgegengesetzter Richtung, d. h. es werden Peptidbindungen gelöst und anfangs einfachere Polypeptide, später freie Aminosäuren gebildet. Die Menge formoltitrierbarer endständiger Aminogruppen (NH_2) nimmt also während der Verdauung zu.

Bei den folgenden Titrierungen haben wir es mit Salzen von Aminosäuren oder Polypeptiden zu tun. Diese Stoffe sind sämtlich „amphoter“ und können sowohl Salzsäure (an den Aminogruppen), wie auch Natriumhydroxyd (an den Carboxylgruppen) binden. Die Versuche wurden so vorgenommen, daß Hydrochloride der betreffenden Stoffe mit $^{n}/_{10}$-NaOH titriert wurden. Zuerst sollte untersucht werden, welchen Einfluß die relativen Mengen von Aminogruppen und Carboxylgruppen auf die Titierungszahlen haben. Titriert wurde das Hydrochlorid von 1. einer Aminosäure, die zwei Carboxylgruppen auf je eine Aminogruppe enthält, nämlich Glutaminsäure, 2. dasjenige von einer Aminosäure, die zwei Aminogruppen auf je eine Carboxylgruppe enthält, nämlich Lysin; 3. dasjenige von

einer Aminosäure, die ebenso viele Amino- wie Carboxylgruppen enthält, nämlich Glycin; die Resultate waren die folgenden:

Tabelle I.

$^n/_{10}$-Lösung (die Normalität berechnet in bezug auf die NH_2—HCl-Gruppen).

	G.	K.	L.	Ph.	K.—G.	Formoltitrierung
Glutaminsäure-Hydrochlorid	ca. 16	90	98	100	74	46
Lysin-Hydrochlorid . . .	ca. 6	24	25	25	18	48
Glycin-Hydrochlorid . .	ca. 10	48	49	50	38	50

Es erhellt aus diesen Zahlen, daß das Verhältnis zwischen Carboxyl- und Aminogruppen von ausschlaggebender Bedeutung für die Relation zwischen Titrierungs- und Formoltitrierungszahlen ist. Erstere richten sich nämlich nach der Menge der Carboxylgruppen und entsprechen somit einer $^n/_{10}$- bzw. $^n/_{40}$- und $^n/_{20}$-Konzentration derselben (Phenolphthalein-Zahlen 100, 25 und 50), letztere richten sich dagegen nach der Menge der Aminogruppen und geben daher alle ungefähr die Zahl 50 (entsprechend einem $^n/_{20}$-Gehalt an Aminogruppen, 46, 48 und 50). Nur wenn die Menge der Aminogruppen ebenso groß wie die der Carboxylgruppen ist, sind die Formoltitrierungszahl und die Differenz zwischen Kongo- und Günzburg-Zahl mit Annäherung gleich groß; man wird sich aus einer vorhergegangenen Mitteilung erinnern, daß dieses letztere stets der Fall war bei Titrierungen von verschiedenen Verdauungsmischungen; die natürlich vorkommenden Proteine und deren Abbauprodukte müssen also im grossen und ganzen ungefähr die gleiche Anzahl freier Amino- und Carboxylgruppen enthalten. Daß die Differenz (K. — G.) im obenstehenden Beispiel (Glycin) ein wenig kleiner als die Formoltitrierungszahl ist, muß man der Hydrolyse des Glycinhydrochlorids zuschreiben, die sich dadurch anzeigt, daß die Günzburg-Zahl 10 ist, obgleich nur das Salz und keine überschüssige freie Salzsäure in der Lösung zugegen ist. Die freie Salzsäure, die mit der Günzburgschen Reaktion nachgewiesen wird, muß also von der hydrolytischen Spaltung des Salzes herrühren. Der Umschlag ist auch hier sehr schwierig zu erkennen, ganz wie

bei den früher erwähnten Pankreatin-Erepsinversuchen. Es ist daher nicht leicht, mittels Günzburgs Reagens die Größe der Hydrolyse eines Hydrochlorids genau quantitativ zu bestimmen, die Methode wird aber, wie die folgende Tabelle zeigt, zu gröberen Schätzungen des Hydrolysegrades brauchbar sein, wenn man nicht zu starke Konzentrationen verwendet.

Die Hydrolysegrade, die in der ersten Kolonne aufgeführt sind, wurden aus den von Lundén[1]) gesammelten basischen Dissoziationskonstanten der Aminosäuren und Polypeptide berechnet. Die daraus berechneten Günzburg-Zahlen sind in der zweiten, die gefundenen in der dritten Kolonne angeführt.

Tabelle II.

Hydrolyse von Hydrochloriden in $^{n}/_{32}$-Lösung.

	Hydrolyse %	Günzburg-Zahl berechnet	Günzburg-Zahl titriert
Asparaginsäurehydrochlorid . . .	42	13	ca. 15
Asparaginhydrochlorid	35	11	ca. 11
Glycinhydrochlorid	28	9	ca. 10
Alaninhydrochlorid	24	7	ca. 9
p-Aminobenzoesäurehydrochlorid .	26	8	ca. 10
m-Aminobenzoesäurehydrochlorid .	11	4	4
Leucinhydrochlorid	30	9	5
Glycylglycinhydrochlorid	12	4	0
Leucylglycinhydrochlorid	10	3	3
Alanylglycinhydrochlorid	12	4	3

Die Übereinstimmung zwischen den berechneten und den gefundenen Günzburg-Zahlen ist so gut, wie man sie erwarten durfte.

Die Hydrolyse der Hydrochloride der meisten Aminosäuren ist von Winkelblech[2]), diejenige der drei Polypeptide von Euler[3]) durch Leitfähigkeitsbestimmungen untersucht worden. Es erhellt aus den Zahlen, daß die Hydrolyse der letzteren bedeutend geringer als diejenige der ersteren ist. Es ist wahrscheinlich, daß man hierdurch das verschiedene Verhältnis der Günzburg-Zahlen bei der Pepsinverdauung und bei der Pankreatin-Erepsinverdauung erklären kann. Im ersten Falle war der Umschlag sehr scharf und die Differenz (K. — G.) genau

[1]) Harald Lundén, Journ. of Biol. Chem. 4, 267, 1908.
[2]) K. Winkelblech, Zeitschr. f. physikal. Chem. 36, 546, 1901.
[3]) H. Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 213, 1907.

ebenso groß wie die entsprechende Formoltitrierungszahl, wie man es bei geringer oder fehlender Hydrolyse erwarten muß. Bei der Pankreatin-Erepsinverdauung dagegen war der Umschlag der Günzburgschen Reaktion kaum zu erkennen, ganz wie bei den stark hydrolysierten Aminosäurehydrochloriden, und es war demzufolge auch nicht möglich, die Differenz (K. — G.) genau zu bestimmen.

Man muß also annehmen, daß die Hydrolyse der Hydrochloride der Albumosen und Peptone sehr gering ist.

Die Angaben über diese Frage, die man in der Literatur findet, sind nicht übereinstimmend. Sjöquist[1]) gibt für Albumosehydrochloride den Hydrolysegrad von 18,6 % an, für Albuminhydrochlorid denjenigen von 17,4 % an, während Erb[2]) den Hydrolysegrad von Eiweißhydrochlorid zu 60 bis 80 % schätzt. Auch Spiro und Pemsel[3]) wie auch Bugarszky und Liebermann[4]) fanden eine recht große Hydrolyse. Sjöquists Zahlen sind die mit meinen Versuchen am meisten übereinstimmenden; jedenfalls müßte eine stärkere Hydrolyse sich bei den Günzburg-Zahlen deutlich zu erkennen geben, und die hohen Zahlen Erbs müssen daher wahrscheinlich als unrichtig angesehen werden.

Zuletzt sollen einige Titrierungen tabellarisch aufgestellt werden, die über das Verhältnis der Lackmus- und Phenolphthalein-Zahlen bei Aminosäuren und Polypeptiden Aufklärung geben. Wie früher erwähnt, hatte ich nur fünf Polypeptide zu meiner Verfügung und von denselben nur eine sehr geringe Menge. So konnte ich das Diglycylglycinhydrochlorid nur in $^{n}/_{80}$-Lösung titrieren. Vergleicht man diese Lösung mit den ihr äquivalenten Lösungen von Glycylglycinhydrochlorid und Glycinhydrochlorid, so bekommt man die folgenden Titrierungszahlen:

Tabelle III.

	G.	K.	L.	Ph.
$^{n}/_{80}$-Glycinhydrochlorid	3	12	13	13
$^{n}/_{80}$-Glycylglycinhydrochlorid	0	12	13	16
$^{n}/_{80}$-Diglycylglycinhydrochlorid	0	12	13	18

1) J. Sjöquist, Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 1, 1889.

2) W. Erb, Zeitschr. f. Biol. 41, 309, 1901.

3) K. Spiro und W. Pemsel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 233, 1898.

4) St. Bugarszky und Leo Liebermann, Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 51, 1898.

Die Phenolphthalein-Zahl steigt also mit der Anzahl von Peptidbindungen von 13 bei Glycin bis zu 18 bei Diglycylglycin.

Die vier anderen Polypeptide konnten in $^{n}/_{32}$-Lösung ihrer Salze titriert werden, und beim Vergleich mit den entsprechenden Aminosäuren von derselben Konzentration bekommt man die folgenden Zahlen (Tyrosin ist wegen geringer Löslichkeit nicht untersucht worden).

Tabelle IV.

	G.	K.	L.	Ph.
$^{n}/_{32}$-Glycinhydrochlorid	ca. 10	31	32	32
$^{n}/_{32}$-Leucin „	5	31	32	32
$^{n}/_{32}$-Alanin „	ca. 9	31	32	32
$^{n}/_{32}$-Glycylglycinhydrochlorid	0	31	32	42
$^{n}/_{32}$-Leucylglycin „	3	31	34	42
$^{n}/_{32}$-Alanylglycin „	3	31	33	40
$^{n}/_{32}$-Glycyltyrosin „	0	31	32	33

Es erhellt aus dieser Tabelle, daß die Phenolphthalein-Zahlen für die Polypeptide bedeutend höher als für die entsprechenden Aminosäuren sind (vielleicht mit Ausnahme des Glycyltyrosinhydrochlorids), während die Lackmuszahlen nur geringe Verschiedenheiten zeigen und die Kongozahl überall dieselbe bleibt.

Diese Untersuchungen sind mit dem früher erwähnten Versuche von Henriques und S. P. L. Sörensen in guter Übereinstimmung, und die Deutung davon ist wahrscheinlich die vom letzteren Verfasser angegebene, daß die Gruppe CO—NH (die „Peptidbindung") imstande ist, als eine schwache Säure aufzutreten und dadurch die Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthalein-Zahlen zu bedingen. Tatsächlich steigt ja diese Differenz mit der Anzahl von Peptidbindungen, wie die Tabelle III es deutlich zeigt. Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt, muß man also die während der Pepsinverdauung zunehmende Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthalein-Zahlen durch Bildung von Polypeptiden, und das Abnehmen derselben Differenz während der Pankreatin-Erepsinverdauung durch Bildung von Aminosäuren erklären.

Die Resultate, die in diesem Abschnitte gewonnen sind, waren somit:

1. Das Günzburgsche Reagens ist zum Nachweis und zur groben quantitativen Bestimmung der Hydrolyse von Hydrochloriden verwendbar.

2. Die natürlich vorkommenden Proteine und deren peptische Verdauungsprodukte sind nur in geringem Grade hydrolysiert und verhalten sich titrimetrisch ungefähr wie Polypeptide.

3. Die Hydrochloride der bei der Pankreatin-Erepsinverdauung gebildeten freien Aminosäuren zeigen eine starke Hydrolyse und verhalten sich titrimetrisch ungefähr wie reine Aminosäuren.

Untersuchungen über freie und gebundene Salzsäure im Mageninhalt.

IV. Mitteilung.

Die Bestimmung der Gesamtsalzsäure im Mageninhalt.

Von

Johanne Christiansen.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Es wurde in der ersten Mitteilung erwähnt, daß die Bestimmung freier Salzsäure durch Titrierung in der letzten Zeit stark kritisiert wurde, und es wurde nachgewiesen, daß diese Kritik in unserem Falle nicht zutreffend war.

Auch die Frage von der Möglichkeit der Bestimmung der Gesamtsalzsäure bei Titrierung ist eine sehr umstrittene gewesen.

Die ersten Forscher auf diesem Gebiete (Leube, v. d. Velden, Ewald, Boas) glaubten, daß es ganz unmöglich sei, die Gesamtsalzsäure durch Titrierung zu bestimmen, da Milchsäure als ein konstantes Produkt der Verdauung angesehen wurde und also wahrscheinlich die Titrierungszahlen in hohem Grade beeinflußt. Eine Folge dieser viel verbreiteten Ansicht war, daß eine große Menge chemischer Methoden entstanden, die die Bestimmung der Gesamtsalzsäure beabsichtigten, weil man ja den Titrierungsmethoden nicht vertrauen konnte. Außerdem meinten viele Verfasser, daß die sauren Phosphate des Mageninhalts einen großen Teil der Gesamtacidität ausmachten, und daß also die letztere als von den folgenden vier Faktoren abhängig angesehen werden mußte: 1. von der freien Salzsäure, 2. von der an Albumosen und Peptonen gebundenen Salzsäure (die zusammen die Gesamtsalzsäure ausmachen), 3. von organischen Säuren, 4. von sauren Salzen. Daß dieses theoretisch richtig ist, ist unbestreitbar; es hat aber seine praktische Bedeutung verloren, seitdem Martius[1]) 1892 nachgewiesen

[1]) Martius und Lüttke, Die Magensäure des Menschen. Stuttgart 1892.

hat, daß die Gesamtacidität, bestimmt durch Titrierung mit Phenolphthalein, nahezu immer mit der nach Lüttkes Methode bestimmten Gesamtsalzsäure zusammenfällt; weder Milchsäure noch saure Salze konnten also irgend eine bedeutende Rolle als Faktoren der Gesamtacidität spielen. Es zeigte sich zwar, daß die von Martius und Lüttke verwendete Methode nicht völlig zuverlässig war, weil sie zu hohe Zahlen für die Gesamtsalzsäure gibt, und die Übereinstimmung mit der Gesamtacidität fußte eben darauf, daß auch Phenolphthalein zu hohe Zahlen für letztere gibt, aber die Schlußfolgerung war doch richtig und fand nach wenigen Jahren eine direkte Bestätigung, indem Boas[1]) im Gegensatz zu seinem eigenen früheren Versuche, nachwies, daß Milchsäure tatsächlich sehr selten im Mageninhalt zu finden ist.

In bezug auf die sauren Salze hat Tabora[2]) gefunden, daß auch diese nicht in solcher Menge zugegen sind, daß sie die Titrierungszahlen in bedeutendem Grade beeinflussen könnten.

Die Frage nach dem Anteil der Gesamtsalzsäure an der Gesamtacidität ist bei diesen Untersuchungen vereinfacht worden, indem diese zwei Größen im allgemeinen als identisch betrachtet werden können, da organische Säuren und saure Salze nur in seltenen Fällen eine Rolle spielen. Mit diesen beiden Fehlerquellen ist auch der Anlaß zur Benutzung der verschiedenen beschwerlichen Methoden der Gesamtsalzsäure-Bestimmung weggefallen, weil ja die einfache Titrierung in der Regel hinlänglich genau ist. Die ganze Angelegenheit ist daher in den letzten Jahren etwas in den Hintergrund getreten, obgleich noch einige ungelöste Fragen übrig geblieben sind.

Es ist zwar ein großer Vorteil, zu wissen, daß die Gesamtsalzsäure gewöhnlich der einzige Faktor der Totalacidität ist, weil damit zugleich gesagt ist, daß Titrierung überhaupt zu diesem Zwecke verwendbar ist; aber welcher Indicator ist der richtige? Soll man Lackmus (Reißner), Phenolphthalein (Martius), Rosolsäure, Neutralrot, oder Alizarin (Volhard) verwenden, oder soll man zu einer von den „Indicatoren freier Salzsäure", z. B. Kongo (Mörner) oder Dimethyl-amido-azo-benzol (Hári) seine Zuflucht nehmen, denn auch diese hat man zur Bestimmung der Gesamtsalzsäure vorgeschlagen.

Von diesen Indicatoren ist, wie früher erwähnt (S. 33), Lackmus der einzige, dessen Umschlag eben am Neutralpunkt liegt, und man muß also a priori erwarten, daß dieses verwendet werden muß. Nichtsdestoweniger ist Phenolphthalein der von den Klinikern am meisten verwendete Indicator, obgleich er wahrscheinlich zu hohe Zahlen gibt. Die Ursache hierzu liegt teils in dem schönen und leicht zu erkennenden Umschlag dieses Indicators, teils in der noch mangelhaften Kenntnis von der eigentlichen Bedeutung der Indicatoren. Es wird zwar von vielen Verfassern erwähnt, daß Phenolphthalein höhere Zahlen als Lackmus gibt; dieses Faktum wird aber ganz ohne Kommentar hingestellt;

---

[1]) J. Boas, Zeitschr. f. klin. Med. **25**, 285, 1894.

[2]) V. Tabora, Zeitschr. f. klin. Med. **56**, 369, 1905.

der einzige, der näher auf die Sache eingeht, ist Fr. Volhard[1]), der in einer Arbeit von 1903 betont, das Phenolphthalein ein alkalisch gelegener Indicator ist, dessen Umschlag nicht wie derjenige des Lackmuspapiers gerade am Neutralpunkt erscheint, sondern erst, wenn die Lösung schwach alkalisch wird. Der Unterschied zwischen Lackmus und Phenolphthalein beruht auf der Bindung von Natriumhydroxyd, ganz wie der Unterschied zwischen Lackmus und Kongo auf der Bindung von Salzsäure beruht, weil ja die Albumosen und Peptone des Mageninhalts amphotere Stoffe sind, die sowohl Base als Säure binden können. Volhard empfiehlt für den praktischen Gebrauch nicht Lackmus, sondern Alizarin, dessen Umschlag etwa an derselben Stelle liegt und leichter zu erkennen ist.

Daß Albumosen und Peptone mit Basen sowohl als mit Säuren Salze bilden, ist früher von St. Bugarszky und L. Liebermann[2]) nachgewiesen worden; Volhard ist aber der erste, der diese Anschauungsweise auf die titrimetrischen Verhältnisse anwendet.

Volhards Auffassung ist wahrscheinlich richtig, er nimmt aber keine Rücksicht auf ein Verhältnis, das doch mit in die Betrachtung kommen muß. Es existiert nämlich die Möglichkeit, daß die eigene Wasserstoffionenkonzentration der Proteine des Mageninhaltes nicht gerade am Neutralpunkt liegt, sondern vielleicht an der Stelle des Kongo- oder Phenolphthalein-Umschlags oder anderswo, und wenn alle Salzsäure von dem Natriumhydroxyd abgespalten und gesättigt ist, ist ja die eigene Wasserstoffionenkonzentration der Proteine für die Reaktion der Lösung ausschlaggebend, da man in der Regel von anderen Faktoren (sauren Salzen und organischen Säuren) absehen kann.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Albumosen und Peptone ist nicht einer direkten Untersuchung zugänglich, da diese Stoffe nicht rein dargestellt werden können; in bezug auf die genuinen Proteine weiß man dagegen nach Untersuchungen von Michaelis, S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen[3]), daß die eigene Reaktion dieser Stoffe auf der sauren Seite liegt, etwa an der Umschlagsstelle des Kongopapiers. Es ist also nicht ganz unmöglich, daß auch die wahre Reaktion der peptischen Verdauungsprodukte anderswo als am Neutralpunkte liegen könnte.

Die Unsicherheit scheint also ebenso groß wie vorher zu sein, aber man kann doch rein theoretisch verschiedene Möglichkeiten ausschließen.

Erstens ist es bekannt, daß die synthetisch dargestellten Polypeptide, die Stoffe ähnlicher Art wie die Peptone sind, alle neutral oder schwach sauer reagieren, alkalische Reaktion der Peptone ist also im voraus nicht zu erwarten.

Zweitens kann man aus den Resultaten früherer Versuche ähnliche Fingerzeige erhalten. Man wird sich daran erinnern (2. Mitteilung), daß die Titrierungszahlen der Indicatoren während der Pepsinverdauung (im

---

[1]) Fr. Volhard, Münch. med. Wochenschr. 2, 2185, 1903.

[2]) St. Bugarszky u. Leo Liebermann, Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 51, 1898.

[3]) S. P. L. Sörensen u. E. Jürgensen, diese Zeitschr. 31, 397, 1911.

Thermostat) von gelöstem Protein sich verschiedener Weise verhielten: Die Günzburg-Zahlen nahmen ab, die Phenolphthalein-Zahlen nahmen zu, und nur die Lackmus-Zahl war ganz unveränderlich. Auch die Kongo-Zahl änderte sich nicht während des größten Teils der Verdauung, aber zeigte doch am Anfange eine kleine Abnahme. Die abnehmenden Günzburg-Zahlen wurden, wie früher erwähnt, von einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen freier und gebundener Salzsäure verursacht, indem mehr Salzsäure gebunden wurde; die Summe dieser Faktoren, die Gesamtsalzsäure, muß aber natürlich während der Thermostat-Verdauung dieselbe sein und kann also nur durch eine von der Verdauung nicht beeinflußte Titrierungszahl ausgedrückt werden, also wahrscheinlich durch Lackmus, möglicherweise auch durch Kongo oder einen dazwischenliegenden Indicator, aber jedenfalls nicht durch Phenolphthalein.

Die Frage ist hierdurch darauf beschränkt worden zu ermitteln, inwieweit die Lackmus- oder die Kongo-Zahlen, oder vielleicht Alizarin den tatsächlichen Zahlen der Gesamtsalzsäure am nächsten liegen.

Zu diesem Zwecke war es nötig, eine von den zahlreichen chemischen Methoden zu erwählen, um die Gesamtsalzsäure zu ermitteln und sie mit den Titrierungszahlen zu vergleichen. Es soll daher eine kurze Darstellung und Kritik von diesen Methoden gegeben werden.

Die chlorometrische Methode, die von Prout[1]) 1825 verwendet wurde, hat besonderes Interesse, teils weil der Nachweis von Salzsäure im Magen mit ihr zum erstenmal erbracht wurde, und teils weil die Methode vielfach benutzt und modifiziert worden ist, namentlich von Hayem und Winter (1891), Martius und Lüttke[2]) (1892) und Reißner[3]) (1903).

Keine von diesen Modifikationen (vielleicht mit Ausnahme von Reißners) kann sich jedoch mit der ursprünglichen Methode Prouts messen. Letztere bestand in einer Differenzbestimmung zwischen der ganzen gegenwärtigen Chlormenge und den teils fixen, teils flüchtigen Chloriden. Die Chlormenge, die nicht in Form neutraler Salze zugegen war, mußte nämlich von der Gesamtsalzsäure herrühren. Prout bestimmte die Menge sowohl von fixen wie auch von flüchtigen Chloriden mit großer Sorgfalt.

Bei den Modifikationen sowohl von Hayem und Winter wie auch von Martius und Lüttke wurde indessen auf die flüchtigen Chloride keine Rücksicht genommen, und die Zahlen für die Gesamtsalzsäure fielen deshalb zu hoch aus. Nichtsdestoweniger sind diese Methoden vielfach benutzt worden, trotzdem es sich zeigte, daß man hierbei immer Salzsäure nachweisen konnte, selbst wenn der Mageninhalt alkalisch auf

---

[1]) W. Prout, Philos. Transactions 1824, S. 45.

[2]) Martius und Lüttke, Die Magensäure des Menschen. Stuttgart 1892.

[3]) O. Reißner, Zeitschr. f. klin. Med. 48, 101, 1903.

Lackmus reagierte! Erst Reißner machte 1903 auf die Notwendigkeit der Berücksichtigung der flüchtigen Chloride aufmerksam und schlug eine Modifikation vor, wobei keine direkte Bestimmung derselben vorgenommen wurde. Sie wurden vielmehr sowohl bei der Bestimmung der Gesamtchlormenge (der Minuend), wie auch bei der Bestimmung der neutralen Chloride (der Subtrahend) eliminiert. Es zeigte sich auch, daß Reißner, ganz wie auch Prout, Zahlen für die Gesamtsalzsäure bekommen hatte, die mit den Lackmus-Zahlen gut übereinstimmten, während die durch Martius und Lüttkes oder durch Hayem und Winters Methoden ermittelten Zahlen in der Nähe der Phenolphthalein-Zahlen lagen.

Prouts und Reißners Methoden geben also wahrscheinlich genaue Resultate; sie sind aber zu den folgenden Untersuchungen nicht verwendbar, aus dem Grunde, weil eine Lackmus-Titrierung einen Teil von der Methode selbst ausmacht, wie man in den Originalarbeiten näher nachsehen kann. Aus solchen Versuchen auf die Zuverlässigkeit der Lackmus-Zahlen zu schließen ist also nicht ganz beweisend.

Eine andere Methode, die eine große Rolle gespielt hat, ist die von Bidder und Schmidt[1]) vom Jahre 1852. Sie bestand in einer Bestimmung der einzelnen Basen (Kalium, Natrium, Calcium und Ammoniak) und der Chlormenge, indem die zur Neutralisation überschüssige Chlormenge von Salzsäure herrühren muß. Auch diese Verfasser fanden mit den Lackmus-Zahlen gut übereinstimmende Werte; sie arbeiteten aber nur mit reinem Magensaft, wo alle die Titrierungszahlen der verschiedenen Indicatoren sehr nahe beieinander liegen, so daß auch diese Versuche für die Richtigkeit der Lackmus-Zahlen nicht ganz beweisend sind.

Bidders und Schmidts Methode gibt zweifellos zuverlässige Resultate; sie ist jedoch wegen ihrer großen Beschwerlichkeit hier nicht benutzt worden.

Außer den erwähnten finden sich nicht wenige Methoden, die der sogenannten „Milchsäurefrage" ihre Enstehung verdanken, und also darauf ausgehen, organische Säuren zu entfernen oder ihren Anteil in der Total-Acidität zu bestimmen. Von dieser Art sind die Methoden von Hehner und Seemann[2]) (1882), Brauns, Cahn und V. Mering[3]) (1886) und Leo[4]). Diese Methoden hatten nur nur so lange eine Bedeutung, bis erkannt wurde, daß organische Säuren sich nur sehr selten im Mageninhalt vorfinden [(Martius[5]) und Boas[6])].

Die Methode, die die größte allgemeine Anerkennung gefunden hat,

---

[1]) Bidder und Schmidt, Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel. 1852.

[2]) H. Seemann, Zeitschr. f. klin. Med. **5**, 272, 1882.

[3]) A. Cahn und J. V. Mering, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **39**, 252, 1886.

[4]) H. Leo, Deutsche med. Wochenschr. **1891**, Nr. 41.'

[5]) Martius und Lüttke, Die Magensäure des Menschen. Stuttgart 1892.

[6]) J. Boas, Zeitschr. f. klin. Med. **25**, 285, 1894.

und die in dem folgenden benutzt werden soll, ist die von Sjöquist[1]) (1889) vorgeschlagene. Sie hat den Nachteil, daß Ammoniumchlorid dabei mitbestimmt wird; da aber die Menge dieses Salzes für sich bestimmt und von den Sjöquist-Zahlen abgezogen werden kann, wird die Verwendbarkeit der Methode dadurch nicht beeinträchtigt. Das Verfahren ist das folgende: Bei Zusatz von Bariumcarbonat, Eindampfen auf dem Wasserbad und Glühen wird die Gesamtsalzsäure (und das Ammoniumchlorid) als Bariumchlorid erhalten. Die Menge dieses Salzes wird danach in filtrierter wässeriger Lösung quantitativ bestimmt. Diese Bestimmung ist nicht ganz leicht, und es existieren daher wenigstens sieben Modifikationen von Sjöquists Methode, die nur das Glühen mit Bariumcarbonat gemeinsam haben. Von diesen ist Bourgets[2]) Modifikation, die von Boas[3]) stark empfohlen worden ist, zu den folgenden Versuchen gewählt worden.

Von neueren Methoden kommt nur die von Cohnheim und Krieger[4]) angegebene Fällungsmethode mit Phosphorwolframsäure in Betracht; diese Verfasser geben aber selbst an, daß ihre Methode zwar leichter, aber nicht so genau wie die Sjöquistsche ist.

Bei der Benutzung der von Bourget modifizierten Sjöquistschen Methode bin ich den von diesen Verfassern, samt den von Boas angegebenen Vorschriften genau gefolgt. Kontrollen mit verschiedenen Mischungen, deren Salzsäuremenge bekannt war, gaben vorzügliche Resultate, indem der Fehler nicht größer war als bei einer gewöhnlichen Titrierung.

Die mit den Sjöquist-Zahlen zu vergleichenden Titrierungen der Tabelle sind teils mit Kongo und Phenolphthalein (52 Fälle), teils mit Lackmuspapier (25 Fälle), teils mit Alizarin (14 Fälle) vorgenommen. Die Menge freier Salzsäure ist außerdem in jedem Falle bestimmt (die Günzburg-Zahlen). Die Fälle sind nach der Größe der Sjöquist-Zahlen geordnet. In der Tabelle bedeuten:

G. = Günzburgs Reagens.
K. = Kongopapier.
A. = Alizarin.
L. = Lackmuspapier.
Ph. = Phenolphthalein.
S.-B. = Sjöquist-Bourgets Methode.

---

[1]) J. Sjöquist, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 1, 1889.
[2]) Bourget, Archive de méd. expér. I. Série, 1, 844, 1889.
[3]) J. Boas, Centralbl. f. klin. Med. 1891, S. 33.
[4]) O. Cohnheim u. H. Krieger, Münch. med. Wochenschr. 1900, S. 381 und Zeitschr. f. Biol. 40, 95, 1900.

Tabelle I.

Filtrate von Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten.

Nr.	Name	G.	K.	A.	L.	Ph.	S.-B.
1	T. N.	71	86	—	93	100	91
2	A. B.	70	81	—	89	92	91
3	H. H.	63	76	80	87	89	86
4	S. A.	49	66	—	75	82	75
5	F. C.	44	66	—	73	81	72
6	L. P.	35	55	—	—	80	71
7	A. B.	—	38	66	—	—	67
8	O. O.	33	59	—	69	79	66
9	M. J.	34	54	—	—	79	66
10	H. F.	49	60	—	—	68	65
11	B. E.	26	50	55	61	68	59
12	B. E.	31	55	—	64	71	61
13	L. L.	28	45	49	52	62	58
14	O. H.	39	53	—	—	67	57
15	F. M.	28	49	—	—	65	57
16	P. J.	23	43	—	—	68	56
17	F. C.	31	45	50	56	60	56
18	F. M.	26	46	—	56	67	55
19	F. W.	27	49	—	—	70	54
20	L. T.	26	46	52	57	64	54
21	M. S.	20	39	—	45	54	53
22	M. M.	23	43	—	54	64	51
23	B. E.	24	40	—	—	61	50
24	F. M.	20	41	—	—	60	49
25	T. J.	18	35	43	47	55	49
26	F. F.	17	42	—	54	63	49
27	E. R.	26	38	—	—	48	47
28	F. J.	23	39	—	—	52	46
29	H. H.	31	41	45	—	49	44
30	J. J.	21	38	—	—	51	44
31	P. L.	5	32	—	46	54	43
32	M. H.	7	25	—	—	49	42
33	B. E.	8	27	—	—	58	42
34	M. H.	1	24	—	—	54	42
35	M. O.	9	20	—	—	30	40
36	H. P.	18	35	—	—	48	39
37	J. P.	7	26	—	38	46	36
38	L. H.	0	20	26	31	43	30
39	M. O.	0	15	—	—	33	29
40	J. L.	0	18	27	—	38	29
41	H. L.	0	23	30	33	46	26
42	R. R.	−4	18	—	26	34	24
43	N. M.	3	20	—	26	33	23
44	F. L.	0	12	—	—	26	20
45	M. L.	0	12	18	—	39	19
46	B. D.	0	9	18	—	34	17
47	H. M.	0	12	—	22	29	16
48	K. L.	0	0	—	7	13	6
49	J. A.	0	0	—	—	13	4
50	G. M.	0	0	1	—	14	0
51	R. R.	0	0	—	4	6	0
52	A. B.	0	0	—	—	4	0

Die Tabelle zeigt, daß die Phenolphthaleinzahlen in nahezu allen Fällen höher als die Sjöquist-Zahlen sind, trotzdem letztere nicht nur die Gesamtsalzsäure, sondern die Summe von dieser und Ammoniumchlorid bedeuten. Es ist also ganz unbestreitbar, daß die Phenolphthalein-Zahlen, wie es auch aus den früheren theoretischen Erwägungen hervorging, zu hohe Werte für die Gesamtsalzsäure wie auch für die Gesamtacidität geben; der Fehler richtet sich nach der Menge von Peptonen und Albumosen des Mageninhalts.

Es findet sich in der Tabelle eine einzige Ausnahme, nämlich Nr. 35, die höhere Sjöquist-Zahlen als Phenolphthalein-Zahlen zeigt; dieser Mageninhalt war stark gallegefärbt, und die Zumischung von Galle ist daher die wahrscheinliche Ursache dieses eigentümlichen Verhaltens. Leider war die Menge des Mageninhalts nicht groß genug zu weiterer Untersuchung; bei künstlicher Zumischung von Galle zu Mageninhalt zeigte es sich aber, daß die Sjöquist-Zahlen sehr hohe Werte erreichten.

Um zu ermitteln, ob die Lackmus- oder die Kongo-Zahlen den Sjöquist-Zahlen am nächsten liegen, war es nötig, sowohl die Lackmus-Zahlen wie auch die Sjöquist-Zahlen ein wenig zu korrigieren. Die Lackmus-Zahlen werden nämlich von dem Gehalt an sauren Phosphaten und die Sjöquist-Zahlen von der Menge Chlorammonium beeinflußt; sie sind somit beide zu hoch aber die Fehler sind nicht groß.

Die Menge saurer Phosphate ist nach Taboras[1]) Untersuchungen an Mageninhalten mit normaler Acidität oder Hyperacidität durchschnittlich 2 (Variationen 1 bis 4 in 17 Fällen). Die Zahlen sind als Titrierungszahlen mit Lackmus berechnet (Taboras eigene Berechnungen gelten Phenolphthalein und geben also doppelt so große Zahlen). Dagegen fand Tabora bei Achylie etwas größere Zahlen (3 bis 10); da aber in der Tabelle nur 5 solche Fälle sich finden, kommen diese Zahlen hier nicht in Betracht. Bei eigenen Untersuchungen habe ich dieselben Zahlen wie Tabora bekommen. Die Korrektion für die Lackmus-Zahl wird also durchschnittlich 2, für die Phenolphthalein-Zahl 4. Die Kongo-Zahl hat keine Korrektion nötig, da die sauren Phosphate diese Zahlen nicht beeinflussen und da organische Säuren nicht vorhanden waren.

[1]) V. Tabora, Zeitschr. f. klin. Med. 56, 369, 1905.

Von den Sjöquist-Zahlen muß die Menge von Ammoniumchlorid abgezogen werden. Diese ist von verschiedenen Verfassern bestimmt worden. Leo[1]) gibt die maximale Zahl von 0,017% Ammoniak[2]) im Mageninhalt an; Rosenheim[3]): 0,01 bis 0,015%; Sticker[4]): 0,006 bis 0,027%; Axel Thomsen[5]) hat endlich in 3 Fällen die Zahlen 0,009, 0,032 und 0,003% gefunden. Meine eigenen Untersuchungen zeigen hiermit gute Übereinstimmung; sie betreffen 18 Fälle und gaben die durchschnittliche Zahl 0,007% Ammoniak im Filtrat von Mageninhalt nach Ewalds Probefrühstück. Der dementsprechende Fehler in den Sjöquist-Zahlen ist 5; die Variationen der Fehler waren 1 bis 8. Die Korrektion der Sjöquist-Zahlen beträgt somit durchschnittlich 5. Um diese Korrektionen auszuführen, muß man von den 23 Fällen, wo sowohl mit Lackmus wie mit Kongo und Phenolphthalein titriert worden ist, die Durchschnittszahlen nehmen. Die Zahlen werden die folgenden:

Kongo: 44. Keine Korrektion.
Lackmus: 54. Korrigiert: 54 — 2 = 52.
Phenolphthalein: 62. Korrigiert: 62 — 4 = 58.
Sjöquist-Bourget: 55. Korrigiert: 55 — 5 = 50.

Die Sjöquist-Zahl zeigt also die beste Übereinstimmung mit der Lackmus-Zahl, sowohl vor wie nach Korrektion, und die letztere muß daher als Indicator der Gesamtsalzsäure vorgezogen werden. Dieses Resultat ist in guter Übereinstimmung mit den Versuchen von Prout, Reißner und Bidder und Schmidt und stimmt auch mit den früher besprochenen Versuchen über die Änderungen der Titrierungszahlen während der Verdauung gut überein. Auch Alizarin gibt recht gute Werte für die Gesamtsalzsäure und ist zum praktischen Gebrauch, wie Volhard hervorgehoben hat, zu empfehlen.

Daß die Lackmus-Zahl ein Indicator der Gesamtacidität ist, weist, wie früher erwähnt, darauf hin. daß die eigene Reaktion der Albumosen und Peptone neutral ist. Die Peptone

[1]) H. Leo, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 41.
[2]) Das Ammoniak im Mageninhalt rührt größtenteils vom Speichel her (Sticker); ein Teil wird aber während der Verdauung gebildet (Henriques).
[3]) Th. Rosenheim, Centralbl. f. klin. Med. 1892, 817.
[4]) G. Sticker, Münchner med. Wochenschr. 1896, Nr. 42—43.
[5]) Axel Thomsen, Nordisk med. Arkiv 25, Nr. 26, 1893.

verhalten sich somit anders als die genuinen Proteine, deren Wasserstoffionenkonzentration etwa $10^{-4,6}$ ist [S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen[1])] und also ungefähr bei dem Umschlagspunkte des Kongopapiers liegt. Ist aber die Reaktion der genuinen Proteine sauer und diejenige der Albumosen neutral, dann muß während der Verdauung eine intramolekulare Reaktionsänderung von sauer bis neutral vor sich gehen (was natürlich etwas anderes ist als das tatsächliche Abnehmen der Acidität der ganzen Mischung). Diese Änderung der spezifischen Reaktion des Proteins könnte vielleicht das früher besprochene titrimetrische Verhältnis erklären, daß die Kongo-Zahl im Anfange der Verdauung von gelöstem Protein etwas niedriger wird und erst danach unverändert bleibt. Diese Frage läßt sich aber vorläufig nicht endgültig beantworten.

Eine zweite Frage, die namentlich praktisches Interesse hat, ist diejenige, ob man unfiltrierten oder filtrierten Mageninhalt zu den Salzsäurebestimmungen benutzen soll. In den meisten Kliniken benutzt man unfiltrierten Mageninhalt, weil dieser in der Regel höhere Zahlen zeigt, wie es v. Pfungen[2]), v. Jaksch[3]), Martius und Lüttke[4]) und Sjöquist[5]) nachgewiesen haben. Diese Anschauung wird auch durch meine Untersuchungen bestätigt; der Unterschied zwischen den Titrierungszahlen in filtriertem und unfiltriertem Mageninhalt ist jedoch nicht groß und ist verschieden für die verschiedenen Indicatoren.

Die Günzburg- und Kongo-Zahlen zeigen keinen Unterschied, die Lackmus-Zahlen sind durchschnittlich um 1 bis 2 höher, und die Phenolphthalein-Zahlen sind um ca. 5 höher in unfiltriertem Mageninhalt als im filtrierten. Bei diesen Untersuchungen ist der Mageninhalt vor Filtrierung und Abmessung sorgfältig umgeschüttelt worden. Die Sache stellt sich nämlich etwas anders, wenn man den Mageninhalt einige Stunden stehen läßt und sodann die obenstehende klare Schicht von dem Bodensatz abgießt, um danach die beiden zu titrieren, wie es die folgende Tabelle zeigt.

[1]) S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen, diese Zeitschr. 31, 397, 1911.
[2]) R. v. Pfungen, Wiener klin. Wochenschr. 1889, Nr. 6—10.
[3]) R. v. Jaksch, Zeitschr. f. klin. Med. 17, 383, 1890.
[4]) l. c.
[5]) J. Sjöquist, Skand. Arch. f. Physiol. 5, 277, 1895.

Tabelle II.

Nr.	Name		G.	K.	L.	Ph.
1	V. H.	oberste Schicht	0	12	22	29
		unterste „	0	16	33	44
2	F. H.	oberste „	0	21	33	45
		unterste „	0	23	39	54
3	P. P.	oberste „	42	57	64	71
		unterste „	37	55	70	82
4	L. T.	oberste „	26	46	57	64
		unterste „	24	47	63	75

Der Unterschied ist hier recht groß, indem die Günzburg-Zahlen der unteren Schicht niedriger, die Lackmus- und Phenolphthalein-Zahlen dagegen höher als in der obersten Schicht sind. Die Ursache ist wahrscheinlich die, daß die Verdauung und die Lösung der festen Stoffe in der unteren Schicht weiter vorgeschritten ist als in der oberen, und diese Versuche entsprechen also ganz den Versuchen 1 bis 6 der II. Mitteilung. Daß die Lackmus-Zahl im Bodensatz größer ist als in der obenstehenden Schicht muß dieselbe Ursache haben als das Zunehmen dieser Zahl während der Verdauung aufgeschlemmten Proteins (Zwieback, Fibrin usw.), nämlich daß die Salzsäure nicht nur vom gelösten, sondern auch vom festen Stoffe gebunden wird. Wenn diese verdaut werden, geht auch die daran gebundene Salzsäure in Lösung, und die Menge der Gesamtsalzsäure im Filtrat wird also größer. Daß dieses tatsächlich der Fall ist, zeigt sich auch bei Sjöquist-Bestimmungen, indem auch die Sjöquist-Zahlen des Filtrats während der Verdauung zunehmen. In einem solchen Versuche mit Fleischalbumin zeigten die Titrierungen und die Sjöquist-Bestimmungen die folgenden Zahlen:

Tabelle III.

		L.	Ph.	S. — B.
Gleich	Filtrat	96	104	95
	unfiltriert	113	120	—
Nach $1^1/_2$ Stunden Thermostatverdauung (37°)	Filtrat	109	125	108
	unfiltriert	115	132	—

Die Sjöquist-Zahlen steigen in diesem Versuche ganz ebensoviel wie die Lackmus-Zahlen des Filtrats, was nicht anders gedeutet werden kann als dadurch, daß mehr Salzsäure all-

mählich gelöst wird, d. h.: die Menge der Gesamtsalzsäure im Filtrat steigt während der Verdauung von aufgeschlemmtem Protein.

In dem obenstehenden Versuche sind Sjöquist-Bestimmungen an unfiltrierter Lösung nicht vorgenommen; es zeigte sich nämlich, daß große Fehler bei solchen Bestimmungen vorkommen. Bei 10 Sjöquist-Bestimmnngen am unfiltrierten Mageninhalt waren die Resultate in 8 Fällen bedeutend niedriger als im entsprechenden Filtrate, ganz entgegengesetzt dem, was man im voraus erwarten mußte. Außerdem zeigten Doppelbestimmungen große Unterschiede, während die häufig vorgenommenen Doppelbestimmungen am Filtrat beinahe immer vollkommen übereinstimmten. Sjöquist-Bestimmungen am unfiltrierten Mageninhalt sind daher ganz unsicher.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser letzten Mitteilung sind die folgenden:

1. Die Gesamtsalzsäure macht gewöhnlich weitaus den größten Teil der Gesamtacidität aus, indem Milchsäure sehr selten vorhanden ist (Martius und Boas), und saure Phosphate nach Taboras Untersuchungen nur in einer Menge von ca. 2 (Lackmus-Zahlen) zugegen sind. Eine einfache Titrierung der Gesamtacidität gibt also recht genaue Zahlen auch für die Gesamtsalzsäure.

2. Lackmus (oder Alizarin) ist der beste Indicator der Gesamtacidität bei Untersuchung von Mageninhalten nach Ewalds Probefrühstück, während Phenolphthalein zu hohe Zahlen gibt. Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den Ansichten von Prout, Bidder und Schmidt, Reißner und Volhard.

3. Zu den Aciditätsbestimmungen muß man unfiltrierten, gut umgeschüttelten Mageninhalt benutzen.

Außer meinem Chef, Herrn Prof. Kn. Faber, dem ich die Anregung zu diesen Untersuchungen verdanke, muß ich Herrn Prof. S. P. L. Sörensen, dem Direktor der chemischen Abteilung des Carlsberg-Laboratoriums, wo ich unter seiner Leitung einen großen Teil der Untersuchungen ausgeführt habe, meinen herzlichsten Dank abstatten.

Über den Einfluß der Behandlung der Milch auf ihre Labfähigkeit.

Von

Wilhelm Müller.

(Aus der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern.)

(Eingegangen am 19. August 1912.)

Bekanntlich besitzen wir in der Labfähigkeit, d. h. in der Geschwindigkeit, mit der Milch durch Lab zum Gerinnen gebracht werden kann, ein vorzügliches Mittel, um auf leichte und bequeme Art Aufschluß über die mehr oder weniger normale Beschaffenheit einer Milch zu erhalten.

Von einer Reihe von Forschern sind die verschiedenen Zustände der Milch und ihre Beziehungen zur Labfähigkeit studiert worden. Dabei hat sich gezeigt, daß diese Beziehungen sowohl physiologischer als auch pathologischer Natur sein können. Unter den ersteren sind namentlich die Veränderungen der Milch während der Lactationsperiode zu nennen. Ferner kommen in Frage chemische Veränderungen der Milch als Folge einer unerwünschten Tätigkeit von Kleinlebewesen. Veränderungen des normalen Eutersekrets, unter dem Einfluß physikalischer Eingriffe, sind dagegen, abgesehen von der Wärmewirkung, noch wenig untersucht worden. In vorliegender Mitteilung soll versucht werden einige Beiträge zur Veränderung der Labfähigkeit der Milch durch physikalische Einflüsse zu liefern. Die Untersuchungen beziehen sich dabei auf die Veränderungen, die die Labfähigkeit durch das Abkühlen, das Schütteln und das Zentrifugieren der Milch erfährt. Die Labfähigkeitsbestimmungen sind bei allen Versuchen mit demselben Normallab ausgeführt worden, und zwar bei einer Gerinnungstemperatur von 35 ° C.

a) Einfluß des Abkühlens frisch gemolkener Milch auf ihre Labfähigkeit.

Zur Bestimmung der Kühlwirkung sind zwei Reihen von je drei Proben frischer kuhwarmer Milch aufgestellt worden. Die eine Reihe wurde in fließendem Wasser von ca. 10° C kühl gehalten, während die andere Reihe bei 30° C aufgestellt wurde. Nach einer halben Stunde, ferner nach einer und zwei Stunden ist jeweils eine Probe jeder Reihe auf ihre Labfähigkeit untersucht worden. Auf diese Weise konnte sowohl die Veränderung der Gerinnungszeit bzw. Labfähigkeit durch das Kühlen, als auch die beim Stehen in ungekühltem Zustande eintretende Veränderung ermittelt werden.

Ein Einfluß der Milchbakterien darf bei so kurzer Versuchsdauer als ausgeschlossen betrachtet werden.

Die Tabelle I enthält eine Zusammenstellung der in angegebener Weise ausgeführten Versuche.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Milchart	1/2 Stunde		1 Stunde		2 Stunden	
		ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt
1	Einzelmilch	15′ 06″	15′ 10″	15′ 02″	15′ 18″	15′ 22″	15′ 58″
2	"	11′ 10″	11′ 36″	11′ 19″	11′ 41″	11′ 49″	12′ 00″
3	"	17′ 08″	16′ 44″	16′ 42″	17′ 49″	17′ 40″	18′ 15″
4	"	13′ 49″	13′ 40″	14′ 30″	13′ 45″	14′ 17″	14′ 27″
5	"	11′ 40″	12′ 00″	11′ 27″	12′ 04″	11′ 46″	13′ 02″
6	"	17′ 49″	17′ 28″	17′ 20″	17′ 32″	17′ 36″	19′ 04″
7	"	12′ 14″	12′ 30″	12′ 06″	12′ 32″	12′ 22″	12′ 41″
8	Mischmilch	17′ 57″	17′ 48″	17′ 36″	18′ 18″	17′ 06″	18′ 53″
9	"	17′ 55″	18′ 03″	1.′ 46″	18′ 45″	17′ 17″	19′ 05″
10	"	12′ 58″	13′ 23″	12′ 44″	13′ 27″	13′ 07″	13′ 33″
11	"	14′ 13″	14′ 26″	14′ 19″	14′ 37″	14′ 43″	15′ 02″

Betrachten wir die in vorstehender Tabelle niedergelegten Resultate, so ergibt sich, daß die Gerinnungszeiten der ungekühlt aufbewahrten Milchproben relativ konstant sind; nur bei denjenigen Proben, welche während zwei Stunden warm gestanden hatten, ist fast durchwegs eine geringe Vergrößerung der Gerinnungszeit, d. h. eine Abnahme der Labfähigkeit zu konstatieren. Dagegen liegen die Werte für die Gerinnungszeiten der eine halbe und eine ganze Stunde gestandenen Proben innerhalb der Fehlergrenze. Man kann also sagen:

Die Labfähigkeit einer bei ca. 30° C gestandenen Milch ändert sich in der ersten Stunde nicht, nach zwei Stunden nimmt sie ab.

Vergleicht man die für die kühl aufgestellten Milchproben erhaltenen Gerinnungszeiten miteinander, so zeigt sich eine stetige Zunahme; das bedeutet, daß das Kühlen der Milch eine kontinuierliche Abnahme ihrer Labfähigkeit hervorruft.

Vergleichen wir endlich die nach jedem Zeitintervall für die gekühlte und die ungekühlte Milch gefundenen Werte miteinander, so ergibt sich, daß durch die Abkühlung nicht durchweg eine Verlängerung der Gerinnungszeit statthat. Die nur eine halbe Stunde gekühlte Milch zeigt gegenüber der ungekühlten ebensooft eine Verkürzung ihrer Gerinnungszeit wie eine Verlängerung. Wird die Milch aber eine Stunde gekühlt, so ist das Verhältnis ein anderes. Mit einer einzigen Ausnahme gerinnen die gekühlt aufgestellten Milchproben langsamer als die entsprechenden ungekühlten; endlich bedingt eine zweistündige Kühlung immer eine Zunahme der Gerinnungszeit. Daraus geht hervor, daß die Differenz zwischen den Gerinnungszeiten von gekühlter und ungekühlter Milch mit der Aufstellungsdauer wächst, d. h. daß die Labfähigkeit mit zunehmender Kühlungsdauer geringer wird. Diese Erscheinungen treten sowohl bei Einzelmilch wie auch bei Mischmilch auf.

Die Untersuchungen von Burri und Schmid[1]) legten uns den Gedanken nahe, die Zunahme der Gerinnungszeit durch das Kühlen der Milch könnte auf einer Änderung des Aggregatzustandes des Milchfettes beruhen. Wir variierten deshalb unsere Versuche derart, daß wir neben Vollmilch auch Magermilch verwandten.

b) Einfluß des Abkühlens auf die Gerinnungsfähigkeit von Vollmilch und Magermilch.

Diese Versuche wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie die mit Vollmilch angestellten, nur sind von jeder Reihe nur zwei Proben aufgestellt worden. Die eine Reihe ist wiederum eine halbe Stunde bzw. zwei Stunden im fließenden Wasser bei 10° C gehalten worden, während die andere Reihe

[1]) Burri u. Schmid, Die Beeinflussung d. Verlaufs d. sog. Schardinger-Reaktion durch d. Kühlung d. Milch. Diese Zeitschr. **36**, 376.

ebenso lange bei 30° C gestanden hatte. In nachstehender Tabelle enthalten die Vertikalstäbe die Resultate für die Gerinnungszeiten von ungekühlter und gekühlter Milch nach einer halben und nach zwei Stunden. Während bei den Milchproben von den Versuchen Nr. 12 und 13 nur die Werte für die Vollmilch und die daraus durch Zentrifugieren erhaltene Magermilch angegeben sind, erstreckt sich die Untersuchung bei den Proben Nr. 14, 15 und 16 auf:

1. Vollmilch;

2. Magermilch, durch Zentrifugieren aus der Vollmilch gewonnen;

3. Regenerierte Vollmilch, hergestellt aus Magermilch, der so viel Rahm zugesetzt wurde, daß der Fettgehalt des Gemisches demjenigen der ursprünglichen Vollmilch entsprach.

Die Versuchsergebnisse finden sich in Tabelle II.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Milchart	1/2 Stunde		2 Stunden	
		ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt
12	Vollmilch	20′ 00″	19′ 07″	19′ 16″	18′ 56″
	Magermilch	22′ 05″	21′ 48″	22′ 52″	23′ 35″
13	Vollmilch	15′ 48″	15′ 58″	15′ 24″	16′ 03″
	Magermilch	16′ 54″	17′ 00″	16′ 35″	18′ 40″
14	Vollmilch	13′ 35″	14′ 17″	14′ 14″	15′ 05″
	Magermilch	15′ 47″	16′ 14″	16′ 18″	17′ 26″
	Magermilch + Fett	14′ 29″	15′ 20″	15′ 47″	16′ 42″
15	Vollmilch	11′ 46″	12′ 12″	12′ 33″	13′ 13″
	Magermilch	13′ 34″	13′ 53″	13′ 39″	14′ 25″
	Magermilch + Fett	12′ 42″	13′ 27″	13′ 13″	13′ 52″
16	Vollmilch	13′ 20″	13′ 15″	14′ 05″	15′ 15″
	Magermilch	14′ 02″	14′ 04″	14′ 47″	16′ 28″
	Magermilch + Fett	14′ 07″	15′ 04″	14′ 50″	15′ 31″

Die in Tabelle II verzeichneten Werte für Vollmilch interessieren uns jetzt weniger; sie zeigen dasselbe Bild wie in Tabelle I. Eine unerklärte Ausnahme von der Regel bildet allerdings die Probe Nr. 12.

Aber auch die Magermilch erleidet durch das Kühlen eine Zunahme ihrer Gerinnungszeit, die um so größer ist, je länger die Kühlung dauert. Wäre unsere oben ausgesprochene

Annahme richtig und beruhte die Zunahme der Gerinnungszeit beim Kühlen auf einer Zustandsänderung des Milchfettes, so könnte natürlich eine fettfreie Milch (Magermilch) keine solche Zunahme zeigen. Die Zunahme der Gerinnungszeit ist also vom Fett unabhängig und wird wahrscheinlich durch eine uns noch unbekannte Wirkung der Kühlung auf die Eiweißstoffe hervorgerufen.

Was die aus Magermilch und Fett regenerierte Milch betrifft, so zeigt sie natürlich gleichfalls eine Zunahme ihrer Gerinnungszeit beim Kühlen. Beim Vergleichen der untereinander stehenden Werte von Vollmilch, Magermilch und regenerierter Vollmilch zeigt Vollmilch die kürzeste Gerinnungszeit, Magermilch die längste, die regenerierte Vollmilch liegt in der Mitte. Dies ist durchweg der Fall, für gekühlte und ungekühlte Milch.

Im Anschluß an diese Versuche studierten wir noch den Einfluß des längeren Kühlens. Wir stellten die Milch 2, 4 und 6 Stunden in fließendes Wasser von 10° und verglichen ihre Gerinnungszeit mit derjenigen einer ebensolange ungekühlt bei 30° aufbewahrten Milch. Die bei diesen Versuchen erhaltenen Resultate sind in Tabelle III niedergelegt.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Milchart	2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden	
		ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt
17	Vollmilch . .	12′ 16″	12′ 47″	11′ 24″	13′ 21″	< 11′ 00″	14′ 45″
	Magermilch .	13′ 22″	13′ 31″	13′ 13″	14′ 10″	10′ 00″	16′ 00″
	Magermilch + Fett . . .	12′ 42″	12′ 57″	12′ 00″	13′ 47″	9′ 00″	15′ 16″
18	Vollmilch . .	12′ 24″	14′ 24″	8′ 47″	14′ 23″	gerinnt spontan	16′ 46″
	Magermilch .	15′ 50″	15′ 55″	12′ 49″	16′ 45″	2′ 57″	18′ 33″
	Magermilch + Fett . . .	15′ 02″	14′ 55″	12′ 28″	16′ 25″	gerinnt spontan	17′ 12″

Wie aus der Zusammenstellung ersichtlich ist, bieten die beiden Milchproben das nämliche Bild dar: Eine stetige Zunahme der Gerinnungszeit mit der Kühldauer; eine Kühlung von 2 Stunden hat noch nicht genügt, ein gewisses Gleichgewicht herbeizuführen, sondern der Vorgang der Abnahme der

Labfähigkeit schreitet kontinuierlich weiter und scheint selbst nach 6stündiger Kühlungsdauer keinen Stillstand erreicht zu haben. Die ungekühlte Milch verhält sich umgekehrt; ihre Gerinnungszeit nimmt mit wachsender Aufstellungszeit ab.

Die ungekühlt aufgestellte Milchprobe Nr. 18 gerinnt nach 6stündigem Stehen sogar spontan. Dies rührt natürlich davon her, daß die bei 30° aufgestellte Milch ein sehr guter Nährboden für Bakterien ist, die entweder durch Säure- oder durch Labbildung die Gerinnung der Milch beschleunigen können.

Um die Selbstgerinnung der Milch zu vermeiden, stellten wir in den folgenden, in Tabelle IV niedergelegten Versuchen die ungekühlte Milch bei 20° auf. Andererseits bestimmten wir die Gerinnungszeit der kuhwarmen Milch direkt nach dem Melken, wodurch wir einen Ausgangswert erhielten, mit dem sich die übrigen Werte vergleichen ließen.

Tabelle IV.

Vers. Nr.	Milchart	Direkt nach dem Melken	2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden	
			un-gekühlt	gekühlt	un-gekühlt	gekühlt	un-gekühlt	gekühlt
19	Vollmilch .	9' 49"	9' 49"	9' 58"	10' 34"	10' 25"	12' 47"	11' 46"
	Magermlich	10' 44"	10' 55"	11' 11"	11' 10"	11' 05"	12' 48"	13' 30"
	Magermilch + Fett .	10' 23"	10' 22"	11' 56"	10' 30"	11' 12"	11' 42"	12' 06"
20	Vollmilch .	15' 17"	16' 15"	16' 56"	16' 28"	17' 57"	16' 35"	19' 18"
	Magermilch	18' 12"	18' 38"	19' 02"	19' 09"	19' 09"	20' 20"	21' 04"
	Magermilch + Fett .	16' 27"	16' 49"	17' 47"	16' 40"	18' 07"	18' 20"	19' 45"
21	Vollmilch .	17' 29"	17' 01"	16' 57"	17' 49"	18' 14"	19' 41"	19' 25"
	Magermilch	18' 25"	18' 10"	18' 29"	19' 30"	19' 20"	20' 53"	20' 57"
	Magermilch + Fett .	17' 05"	16' 55"	17' 25"	17' 48"	18' 20"	19' 08"	20' 15"

Die Gerinnungszeit der ungekühlten Milch direkt nach dem Melken und nach 2stündigem Stehen bei 20° zeigt keine wesentliche Differenz. Erst nach 4 und 6 Stunden findet eine deutliche Zunahme statt. Im übrigen zeigt auch diese Tabelle, wie die vorige, eine mit der Kühlungsdauer proportionale Zunahme der Gerinnungszeit. Auch hier ergeben sich für die Magermilch durchweg höhere Werte wie für die ursprüngliche

Vollmilch. Wir kamen deshalb auf die Idee, dieses Plus rühre vom Zentrifugieren her. Die Erschütterung lagere die Eiweißstoffe um, was sich dann in einer Zunahme der Gerinnungszeit dokumentiere. Wäre das der Fall, so müßte auch ein Schütteln der Milch im Schüttelapparat die Gerinnungszeit vermehren.

c) Einfluß des Zentrifugierens und des Schüttelns der Milch auf ihre Labfähigkeit.

Der Versuch, der zur Lösung dieser Fragen angestellt wurde, ist folgendermaßen durchgeführt worden: Gleich nach dem Melken ist ein Teil der Vollmilch zentrifugiert und sowohl bei der Vollmilch als auch bei der Magermilch sofort nach dem Melken resp. Zentrifugieren und nach 2-, 4- und 6stündiger Abkühlung auf ca. 10° die Labfähigkeit ermittelt worden. Eine weitere Probe jeder Milchart wurde sofort nach dem Melken bzw. Zentrifugieren und nach 4stündiger Abkühlung ½ Stunde bei Zimmertemperatur im Wagnerschen Schüttelapparat geschüttelt und hernach in den einzelnen Proben die Labfähigkeit bestimmt.

Tabelle V.

		1	2	3	4	5	6	7
Vers. Nr.	Milchart	Direkt nach dem Melken	2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden	
			ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt	ungekühlt	gekühlt
22 a)	Vollmilch . .	16′ 24″	16′ 34″	17′ 12″	17′ 47″	18′ 36″	17′ 56″	18′ 59″
b)	Vollmilch ½ Std. geschüttelt . .	18′ 00″	—	—	—	18′ 55″	—	—
c)	Magermilch .	18′ 43″	18′ 59″	18′ 48″	20′ 32″	20′ 59″	20′ 29″	21′ 32″
d)	Magermilch ½ Std. geschüttelt . .	19′ 45″	—	—	—	21′ 25″	—	—

Wie aus dieser Tabelle und übrigens auch aus der vorigen Tabelle IV hervorgeht, wird durch das Zentrifugieren der Milch tatsächlich eine Veränderung der Labfähigkeit im Sinne einer Abnahme derselben bewirkt; diese Abnahme entspricht ungefähr demselben Werte, wie er durch eine 4stündige Abkühlung erhalten wird (vgl. Stab 1c mit Stab 5a). Daß man aber mittels

des Zentrifugierens noch nicht an dem tiefsten Punkte angelangt ist, zeigen Stab 7 Reihe c und Stab 5 Reihe d. Aus diesen beiden Resultaten geht hervor, daß die Magermilch nach 6stündiger Kühlung dieselbe Labfähigkeit besitzt, wie eine während 4 Stunden gekühlte und $^1/_2$ Stunde geschüttelte Milch.

Der 1. Vertikalstab zeigt, daß das Schütteln bei Vollmilch wie bei Magermilch die Labgerinnungszeit wesentlich erhöht. Die Erhöhung entspricht ungefähr einer solchen, die durch 3stündiges Kühlen einer ungeschüttelten Milch hevorgerufen würde. (18′ liegen zwischen 17′ 12″ und 18′ 36″ für Vollmilch; 19′ 45″ liegt zwischen 18′ 48″ und 20′ 59″ für Magermilch).

Stab 5 zeigt, daß das Schütteln auch die Gerinnungszeit der 4stündig gekühlten Milch erhöht, aber nur noch unwesentlich (von 18′ 36″ auf 18′ 55″ bei der Vollmilch und von 20′ 59″ auf 21′ 25″ bei der Magermilch). Die Zunahme beträgt gerade soviel, wie ein weiteres 2stündiges Kühlen der ungeschüttelten Milch ausmacht (siehe Stab 7).

Zusammenfassung der Resultate.

In obiger Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die Größe der Labgerinnungszeit bzw. Labfähigkeit einer Milch nicht unwesentlich abhängt von ihrer Vorbehandlung. Das Kühlen der Milch bewirkt eine Zunahme der Gerinnungszeit. Diese Zunahme äußert sich nur undeutlich nach $^1/_2$ Stunde, ist aber immer ausgeprägt nach 2 Stunden, um bei weiterer Kühlung bis 6 Stunden und wahrscheinlich darüber hinaus noch zuzunehmen, falls nicht bakterielle Vorgänge in der Milch dieser Tendenz entgegenwirken. Diese Erscheinung der Zunahme der Labgerinnungszeit hängt nicht mit dem Milchfett zusammen, sondern ist vermutlich bedingt durch eine nicht näher bekannte Änderung, die die Eiweißstoffe beim Kühlen erleiden. Dieselbe Änderung kann außer durch Abkühlen auch durch Zentrifugieren und Schütteln der Milch, also durch mechanische Einflüsse bewirkt werden.

Die Ermittlung dieser Tatsachen deckt uns eine der Ursachen auf, die die mangelhafte Übereinstimmung der Resultate von Labgerinnungsversuchen bedingen. Da eine Kühlung während beschränkter Zeit bezüglich der Gerinnungszeit nicht

wie bei der Oberflächenspannung[1]) oder der Schardinger Reaktion zu einem Grenzwert führt, so ist es auch nicht möglich, durch Einhaltung einer bestimmten Kühlungszeit den von der Kühlung bedingten Fehler zu vermeiden. Man wird eine Labgerinnungsbestimmung im allgemeinen mit möglichst frischer Milch ausführen und sich bei Untersuchungen von Milch unbekannter Herkunft immer bewußt bleiben müssen, daß dieselbe Milch im absolut frischen, bzw. ungekühlten Zustande einen wesentlich veränderten Gerinnungswert ergeben haben würde.

---

[1]) Vgl. Burri und Nußbaumer, Oberflächenspannungs- und Viscositätsbestimmungen bei Kuhmilch. Diese Zeitschr. 22, 90.

Versuche über die Verteilung der Phosphorsäure auf Harn und Kot.

Von

Ad. Würtz (Straßburg).

(Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 19. August 1912.)

Unter den mannigfachen, noch wenig geklärten Fragen des Phosphorstoffwechsels hat die wechselnde Verteilung der Phosphorausscheidung auf Harn und Kot vielfach die Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Sie dürfte auch der klinischen Bedeutung nicht ganz entbehren. Die nachstehend mitgeteilten Versuche verfolgten den Zweck festzustellen, inwieweit zugeführte Säuren und Basen diese Verteilung beeinflussen, und zwar kam einerseits Salzsäure, andererseits Calciumcarbonat in Verwendung.

I. Säureversuche.

Ein Kaninchen wurde im Stoffwechselkäfig mit Rüben gefüttert und bekam nach einer $1^{1}/_{2}$tägigen Vorperiode während zweier Tage morgens und abends je 50 ccm Wasser und dann während 3 Tagen morgens und abends je 50 ccm einer $0{,}2^{0}/_{0}$igen HCl-Lösung. Von diesem Termin ab wechselten 3tägige Wasserperioden mit 3tägigen Salzsäureperioden regelmäßig ab. Am Schluß der 3. Wasserperiode ging das Tier ein. Der Versuch erstreckt sich somit auf $1^{1}/_{2} + 2 + (3 \times 3$ HCl-Tage$) + (3 \times 3$ Wassertage$) = 21^{1}/_{2}$ Tage.

Urin und Kot wurden für jede einzelne Periode gesammelt und dann die P_2O_5-Bestimmungen nach dem Neumann'schen Verfahren vorgenommen.

Die ganze Anlage des Versuchs, sowie die gewonnenen Zahlen sind aus Tabelle I ersichtlich. Die $1^{1}/_{2}$tägige Vorperiode ohne Wasserzufuhr bleibt wegen ungenügender Anpassung des Tieres an die ungewohnten Verhältnisse besser außer Betracht.

Tabelle I.

Versuchsperiode	Gereicht	Dauer der Periode Tage	Harn ccm	Harn P_2O_5 %	Harn P_2O_5 g	Harn P_2O_5 pro Tag g	Kot g	Kot P_2O_5 %	Kot P_2O_5 g	Kot P_2O_5 pro Tag g	Gesamt-P_2O_5 pro Periode g	Gesamt-P_2O_5 pro Tag g	Verhältnis von Harn-P : Kot-P
II.	4×50 ccm H_2O	2	540	0,092	0,4983	0,2492	2,19	3,108	0,0680	0,0340	0,5663	0,2832	88,0:12,0
III.	6×50 ccm HCl 0,2%	3	700	0,100	0,6992	0,2331	3,69	2,809	0,1036	0,0345	0,8028	0,2676	87,1:12,9
IV.	6×50 ccm H_2O	3	770	0,107	0,8210	0,2737	22,75	3,094	0,7041	0,2347	1,5251	0,5084	53,8:46,2
V.	6×50 ccm HCl 0,2%	3	910	0,089	0,8482	0,2827	5,17	3,754	0,1941	0,0647	1,0423	0,3474	81,4:18,6
VI.	6×50 ccm H_2O	3	960	0,094	0,9055	0,3018	6,46	3,431	0,2216	0,0739	1,1271	0,3757	80,4:19,6
VII.	6×50 ccm HCl 0,2%	3	1085	0,073	0,7872	0,2624	15,27	3,583	0,5470	0,1823	1,3342	0,4447	59,1:44,9
VIII.	6×50 ccm H_2O	3	760	0,105	0,7962	0,2654	19,09	4,141	0,7905	0,2635	1,5867	0,5289	50,2:49,8
				Mittel 0,095	Summe 5,3556	Mittel 0,2678	Se. 74,62		Summe 2,6289	Mittel 0,1314	Summe 7,9845	Mittel 0,3992	67,1:32,9

Zur Erläuterung obiger Tabelle ist folgendes zu bemerken:

Die tägliche P_2O_5-Ausscheidung im Harn für Wasser- und Säuretage schwankt zwischen 0,2331 und 0,3018 g. Als Mittelwert für die 20 Tage ergibt sich 0,2678 g.

Das Mittel der 11 H_2O-Tage = 0,2792 g.

„ „ „ 9 HCl-Tage = 0,2649 g.

Ein Einfluß der Säurezufuhr auf die Phosphorsäureausscheidung im Harn besteht somit nicht.

Der Prozentgehalt des Harns an P_2O_5 schwankt für Wasser- und Säuretage zwischen 0,073 bis 0,107%.

Das Mittel der 11 H_2O-Tage = 0,099%.

„ „ „ 9 HCl-Tage = 0,087%.

Bei einem mittleren Prozentgehalt von 0,094 ist der Einfluß der HCl-Zufuhr zum mindesten nicht deutlich.

Die Menge des Kots wechselt in den einzelnen Perioden außerordentlich von 3,69 bis 22,75 pro 3 Tage = 1,23 bis 7,58 pro Tag.

Die Gesamtmenge des Kots während der 20 Tage beträgt 74,62 g, also pro Tag im Mittel 3,731 g.

Die Wasserperioden ergeben in 11 Tagen 50,49 g, also

pro Tag im Mittel 4,59; die Säureperioden in 9 Tagen 24,13 g, also pro Tag im Mittel 2,68 g.

In den Säureperioden ist somit eine deutliche Verminderung der Kotabgabe nicht zu verkennen. Ist dies kein Zufall, so würde sie wohl zunächst durch eine geringere Nahrungsaufnahme an den Säuretagen zu erklären sein.

Die tägliche Phosphorsäureausscheidung im Kot zeigt sehr große Schwankungen, von 0,0340 bis 0,2635; diese sind ausschließlich auf eine ungleiche Kotentleerung zu beziehen. Der Prozentgehalt der trockenen Faeces schwankt nämlich von 2,809 bis 4,141, was einem Mittel von 3,423 entspricht, während die Mittelwerte der Wassertage mit 3,474 und der Säuretage mit 3,4326 % so gut wie identisch sind.

Das Verhältnis von Harn-P_2O_5 : Kot-P_2O_5 schwankt zwischen 88 : 12 und 50,2 : 49,8. Beide Grenzwerte fallen auf Wasserperioden. Bei den enormen Schwankungen der Phosphorsäure-Ausscheidung durch den Kot bieten die Werte der Gesamtphosphorsäure keine brauchbare Grundlage für eine Berechnung.

Bemerkenswert an dem Versuch ist, daß der im Harn ausgeschiedene Phosphorsäureanteil für einen Pflanzenfresser sehr hoch ist, so hoch wie für den Menschen und Fleischfresser angegeben wird. Es muß bemerkt werden, daß diese abnorm hohe Ausscheidungszahl schon in der nicht in der Tabelle angeführten $1^1/_2$tägigen Vorperiode bestand (86 : 14) und gerade gegen Schluß der Versuchsreihe, wo das Tier unter dem Einfluß einer chronischen Säurevergiftung stand, einer niedrigeren Platz machte. Sie kann somit nicht auf die Säurezufuhr bezogen werden.

Im ganzen läßt sich das Ergebnis des Versuches dahin zusammenfassen, daß die Zufuhr von Salzsäure per os beim Kaninchen die Verteilung der Phosphorsäure zwischen Harn und Kot nicht beeinflußte.

II. Versuche mit Calciumcarbonat.

Das Ergebnis des Säureversuchs steht in einem gewissen Gegensatz zu der wiederholt festgestellten Tatsache, daß Zufuhr von Calciumcarbonat den im Harn ausgeschiedenen Phosphorsäureanteil auffallend herabsetzt.

Solche Beobachtungen bei Mensch, Pferd, Ziege liegen vor von Haubner[1]), Riesell[2]), Bertram[3]), Strauß[4]), Herxheimer[5]), Oeri[6]). Ein analoges Resultat ergaben Versuche von Tereg und Arnold[7]), in denen ein Hund tertiäres, sekundäres und primäres Calciumphosphat und zum Schluß Calciumcarbonat erhielt.

Dagegen konnte Bergmann[8]) beim Hunde keine Mehrausscheidung von Phosphorsäure in den Harn durch Darreichung von Kalk erzielen.

Beim Kaninchen hat man anscheinend ähnliche Versuche noch nicht ausgeführt.

Meine Versuchsanordnung war folgende: Das Kaninchen wurde im Stoffwechselkäfig untergebracht und bekam neben seinem aus Gerste bestehenden Futter täglich morgens und abends 50 ccm Wasser eingeflößt. Die einzelnen Perioden betrugen 5 Tage, so daß das Tier in den ersten 5 Tagen $5 \times (2 \times 50) = 500$ ccm Wasser erhielt. In der 2. Periode wurde dem Wasser pro Tag 0,1 g Schlemmkreide zugefügt, so daß sich die Kreidezufuhr innerhalb dieser 5 Tage auf $5 \times 0{,}1$ g $= 0{,}5$ g belief. Von Periode zu Periode immer unter Einschaltung je einer 5tägigen Wasserperiode stieg die Kreidemenge um 0,5 g bis zur 10. Periode inklusive. Von der 12. bis 16. wurde die CaO-Menge von Periode zu Periode verdoppelt, so daß das Tier in der letzten 16. Kalkperiode 15 g Kreide, d. h. 3 g pro Tag, bekam. Der Versuch erstreckt sich im ganzen auf 17 Perioden, 9 Wasser- und 8 Kalkperioden. Am 85. Tage des Versuches ging das Tier ein.

Die nach der Neumann'schen Methode bestimmten P_2O_5-Werte sind aus Tabelle II ersichtlich. Die Harne der 4. bis 5., sowie der 8. bis 11. Periode wurden nicht untersucht, da nach den Ergebnissen der ersten Perioden ein deutlicher Ausschlag nur bei großen Kalkdosen zu erwarten war.

Wie aus der Tabelle II zu entnehmen, hat die Zufuhr von Calciumcarbonat auch beim Kaninchen eine Abnahme der Phosphorsäureausscheidung im Harn und eine Zunahme derselben im Kot zur Folge. Während in den kalkfreien Perioden das Verhältnis von Harn-P_2O_5 zu Kot-P_2O_5 unerwartet konstant

1) Magazin f. d. ges. Tierheilk. 1854, 206.
2) Med.-chem. Untersuchungen von Hoppe-Seyler, 1868, Heft 3, S. 319.
3) Zeitschr. f. Biol. 14, 335, 1876.
4) Zeitschr. f. klin. Med. 31, 492, 1897.
5) Berl. klin. Wochenschr. 1897, 423.
6) Zeitschr. f. klin. Med. 67, 1909.
7) Pflüger's Archiv 32, 122, 1883.
8) Arch. f. experim. Pathol. 47, 77, 1902.

Tabelle II.

5-tägige Periode	Tier erhält		Harn	P_2O_5 im Harn		Kot	P_2O_5 im Kot		Gesamt-P_2O_5	Verhältnis von Harn-P : Kot-P
	H_2O ccm	$CaCO_3$ g	g	im ganzen g	pro Tag g	g	im ganzen g	pro Tag g	g	
I.	500	—	380	0,761	0,152	22,35	0,972	0,1944	1,733	44,0:56,0
II.	500	**0,5**	**320**	**0,738**	**0,148**	**60,8**	**2,116**	**0,4240**	**2,854**	**25,8:74,2**
III.	500	—	300	2,502	0,500	87,6	3,210	0,6420	5,712	43,8:56,2
IV.	500	1,0	—	—	—	—	—	—	—	—
V.	500	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VI.	500	**1,5**	**265**	**0,765**	**0,153**	**23,0**	**0,754**	**0,1508**	**1,519**	**50,3:49,7**
VII.	500	—	410	1,293	0,259	33,0	1,264	0,2528	2,557	50,6:49,4
VIII.	500	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—
IX.	500	—	—	—	—	—	—	—	—	—
X.	500	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—
XI.	500	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XII.	500	**3,75**	**320**	**0,469**	**0,094**	**40,0**	**0,885**	**0,1770**	**1,354**	**34,6:65,4**
XIII.	500	—	150	0,751	0,150	49,75	0,950	0,1900	1,701	44,2:55,8
XIV.	500	**7,5**	**340**	**0,612**	**0,122**	**74,25**	**1,625**	**0,3250**	**2,237**	**27,4:72,6**
XV.	500	—	260	0,986	0,197	54,25	1,239	0,2478	2,225	44,4:55,6
XVI.	500	**15,0**	**350**	**0,162**	**0,032**	**55,75**	**1,662**	**0,3324**	**1,824**	**8,9:91,1**
XVII.	500	—	250	1,487	0,297	87,5	1,770	0,3540	3,257	45,6:54,4

ist und im Mittel 45,4 : 54,6 beträgt, ergibt es sich für die Kalktage im Durchschnitt zu 29,4 : 70,6, wobei allerdings große Schwankungen zu verzeichnen sind.

Diese Differenz zwischen Kalk- und kalkfreien Perioden ist nicht etwa durch eine größere Harnausscheidung oder geringere Kotausscheidung an den kalkfreien Perioden bedingt. Im Gegenteil, die Kotausscheidung ist an diesen etwas (um ca. 10 %) größer, so daß die beobachtete Vermehrung der Harn-P_2O_5 um so mehr ins Gewicht fällt.

Die Verminderung der Phosphorsäureausfuhr im Harn ist dabei nicht, wie man erwarten könnte, mit einer entsprechenden Verminderung der Kalkausscheidung im Harn verbunden.

Zwar wurden keine Calciumbestimmungen ausgeführt, doch suchten wir uns in der Weise über die Größe der Kalkausscheidung im Harn zu orientieren, daß von sämtlichen Harnen zum Schluß aliquote Mengen in essigsaurer Lösung mit Ammonoxalat geprüft wurden. Dabei ergaben sich in den Harnen von der 12. Periode ab starke Trübungen bis deutliche Niederschläge, während die früheren Perioden sich als kalkärmer erwiesen.

Nebenbei sei bemerkt, daß in den Harnen der kalkreichen Perioden merkwürdigerweise ein an Calciumoxalat reiches Sediment — typische Briefcouvert-, aber auch viel Hantelformen — beobachtet wurde.

III. Schlußbemerkungen.

Die Ursache der ungleichen Aufteilung der Phosphorsäure auf Harn und Kot ist in der Hauptsache in folgenden Momenten gesucht worden.

1. In einem beschränkten Resorptionsvermögen des Darmtrakts für Phosphate und Kalksalze. Die Art dieser Beschränkung läßt sich auf Grund der ermittelten Tatsache genauer angeben. An der Resorbierbarkeit der löslichen Alkaliphosphate, sowie der löslichen Kalksalze an sich besteht kein Zweifel. Sind aber beiderlei Verbindungen nebeneinander vorhanden, so daß sich Calciumphosphate bilden können, so hängt es wesentlich von der herrschenden Reaktion ab, ob eine Resorption möglich ist oder nicht. Man darf annehmen, daß das sehr schwer bzw. gar nicht lösliche sekundäre und tertiäre Phosphat nicht durch die Darmwand geht, wogegen die Möglichkeit gegeben ist, daß unter Bedingungen, unter denen sich lösliches primäres Calciumphosphat bildet, sowohl Calcium- wie auch Phosphorsäureionen zur Resorption gelangen. Hierzu bedarf es ausgesprochen saurer Reaktion, wie sie zeitweilig im Magen und dem angrenzenden Teil des Dünndarms herrscht.

Sobald der Darminhalt durch die in den Darm sich ergießenden alkalischen Sekrete annähernd neutrale oder alkalische Reaktion im ganzen oder auch nur an der Schleimhautoberfläche annimmt, ist bei gleichzeitiger Anwesenheit von Phosphorsäure- und Calciumionen die Bildung der kaum löslichen Kalkphosphate unvermeidlich und damit die Resorption aufgehoben, aber doch nur, soweit sich Calcium und Phosphorsäure als sekundäres oder tertiäres Salz sättigen.

Ist eines von beiden im Überschuß vorhanden, z. B. als Chlorcalcium oder als Alkaliphosphat, so sind für diesen Überschuß die Bedingungen der Resorption immer noch gegeben, vorausgesetzt, daß nicht die Bildung anderer unlöslicher Verbindungen hindernd in den Weg tritt. So wird die Calciumresorption wegen des Carbonatgehaltes des Darmsaftes notwendig durch die Bildung von Calciumcarbonat beschränkt.

Ähnlich könnte eine Verminderung der Phosphatresorption durch die Anwesenheit von Magnesiasalzen bedingt sein. Doch ist der Einfluß der Magnesiasalze wegen ihrer geringeren Menge und der größeren Löslichkeit der Phosphate auf die Resorption der Phosphorsäure bei weitem geringer als jener der Calciumsalze. Bertram hat dies überdies experimentell festgestellt.

Es ist aber ferner zu bedenken, daß bei den im Darm stetig erfolgenden Verschiebungen eine gleichmäßige Verteilung von Phosphorsäure und Calcium nicht wohl anzunehmen ist. Auch wenn beide Stoffe in äquivalenten Mengen beigebracht werden, wird unter dem Einfluß der Sekrete, der zugeführten Nahrung und der wechselnden Reaktion leicht der Fall eintreten, daß in einer Darmschlinge Phosphate, in einer andern Calciumsalze überwiegen, so daß an diesen Stellen eine Resorption des einen oder des andern Salzes erfolgen kann. Es kann dies sogar zu gleicher Zeit geschehen, und zwar ohne Gefahr einer etwaigen späteren gegenseitigen Ausfällung im Blut, da die geringe Konzentration der resorbierten Lösung und die Verdünnung, die sie überdies durch das in stetem Strom befindliche Blut erfährt, endlich auch die die Fällung verhindernde Wirkung der Bluteiweißkörper (Hofmeister) einer Niederschlagsbildung entgegenwirken.

Nach diesen Erwägungen liegen die Verhältnisse im Darmtrakt so, daß im Magen und obersten Teil des Dünndarms, soweit die saure Reaktion reicht, eine Resorption von Calcium und Phosphorsäure erfolgen kann, tiefer abwärts, wo die Reaktion neutral oder alkalisch wird, wird die Resorption von Calcium wegen Bildung von unlöslichem Phosphat und Carbonat aufgehoben oder doch sehr beschränkt, weniger jene der Phosphorsäure durch Bildung von unlöslichen Magnesiumverbindungen.

2. Man hat ferner zur Erklärung der ungleichen Verteilung der Phosphorsäure auf Harn und Kot die Reaktion des Harnes herangezogen, denn im Harn könnten Phosphorsäure und Calcium nebeneinander nur dann in Lösung bestehen, wenn die Reaktion sauer ist. Das ist richtig, aber für die uns beschäftigende Frage ohne Bedeutung. Maßgebend ist nicht die Reaktion des Harnes, sondern jener Stellen in der Niere (Glomeruli, Epithelien der gewundenen Harnkanälchen), wo die Sekretion erfolgt. Die

Annahmen, daß etwa diese sezernierenden Apparate im Gegensatz zu allen andern lebenden Zellen einen ausgesprochenen Überschuß von Wasserstoffionen aufweisen oder, daß das einmal gebildete, schon abgegebene Sekret auf den Sekretionsvorgang eine maßgebende Rückwirkung äußert, dürfte kaum Anhänger finden. Jedenfalls bedürften sie eines besonderen Beweises.

Die Tatsache, daß gelegentlich Kalkphosphat infolge alkalischer Reaktion im Harn evtl. schon in der Blase ausfällt, beweist nicht etwa, daß sekundäres oder tertiäres Calciumphosphat als solches durch die Niere gegangen ist. Sie erklärt sich vielmehr daraus, daß Calciumsalze und Phosphate nicht direkt nebeneinander, sondern entweder nacheinander und an verschiedenen Stellen der Niere zur Ausscheidung gekommen sind und erst beim Vermengen der Sekretportionen in der Blase aufeinander reagiert haben.

3. Man hat endlich der Sekretion der Kalksalze in den Darm hinein eine große Bedeutung für die Verteilung der Phosphorsäure zugeschrieben. Dabei ist vielfach angenommen worden, daß überschüssiges Kalkphosphat, wenn es im Harn wegen dessen alkalischer Reaktion nicht zur Ausscheidung kommen kann, von der Schleimhaut der unteren Darmabschnitte gewissermaßen vikariierend in den Darm sezerniert wird.

So richtig die Beobachtung ist, so bleibt es doch sehr fraglich, ob man berechtigt ist, der Darmschleimhaut in dieser teleologischen Weise eine besondere Leistung zuzuschreiben. In den Versuchen, wo, wie oben gezeigt, reichliche Zufuhr von Calciumcarbonat die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn vermindert, liegt eine einfache chemische Erklärung näher. Fein verteiltes Calciumcarbonat reagiert mit löslichen Phosphaten unter Bildung von Calciumphosphat (vgl. Tanaka, diese Zeitschrift 35, 128). Auch das in den Darm eingebrachte Calciumcarbonat muß, solange es durch den Darm wandert, die durch Sekretion oder Diffusion herantretende Phosphorsäure fixieren und auf diesem Wege dem Blute einen Teil der Phosphorsäure entziehen, der sonst durch den Harn zur Ausscheidung gekommen wäre.

Aber auch unter normalen Verhältnissen, wenn keine Calciumcarbonatzufuhr statthat, ist in den unteren Darmabschnitten,

wo die Reaktion zunehmend deutlicher alkalisch wird, Ähnliches zu erwarten, wenn der Darminhalt von der Nahrung her erheblichere Kalkquantitäten aufweist. Das Überwiegen der Phosphorsäureausscheidung durch den Kot bei Pflanzenfressern, wenn sie ein Ca-reiches Futter erhalten, ist so ohne weiteres verständlich.

Neben dem Gesagten erscheinen vor allem die im Darmkanal gegebenen Verhältnisse für die Verteilung der Phosphorsäure maßgebend. Bei Abwesenheit von Kalksalzen in der Nahrung wird die Phosphorsäure vorwiegend durch den Harn ausgeschieden. Bei Zufuhr von Kalk nur in dem Maße, erstens als die saure Reaktion in den oberen Darmabschnitten überwiegt, zweitens insoweit nicht im Darm zurückbleibender Kalk in den unteren, alkalische Reaktion darbietenden Darmabschnitten die im Blut zirkulierende Phosphorsäure wieder an sich reißt. Insofern kann die Verteilung der Phosphorsäure auf Harn und Kot als ein Index für die Verbreitung der sauern Reaktion im Darmtrakt gelten.

Säurezufuhr kann diese Verteilung nur dann beeinflussen, wenn sie den sauer reagierenden Abschnitt des Darmtraktes vergrößert. In meinen oben angeführten Versuchen, wo Salzsäure gereicht wurde, war das nicht der Fall, und war auch wegen der großen Diffundibilität der Salzsäure nicht zu erwarten.

Um in einem größeren Teil des Darmes saure Reaktion zu unterhalten, bedürfte es entweder einer Säureüberschwemmung oder der Zufuhr einer kolloidalen, nicht gut resorbierbaren Säure, oder aber eines Stoffes, der auf seinem Wege durch den Darmtrakt andauernd spontan oder unter dem Einfluß von Enzymen bzw. Mikroorganismen Säure bildet. Eine solche weitergehende Säurebildung müßte der Calcium- und Phosphorsäureresorption günstig sein. Die außerordentlich wechselnden Verhältnisse der Phosphorausscheidung beim Menschen sprechen dafür, daß sich diese Säurebildung individuell, möglicherweise auch unter pathologischen Verhältnissen sehr ungleich geltend macht, und es muß weiteren Versuchen überlassen bleiben, festzustellen, ob sich davon für die Praxis der Ernährung, namentlich beim Säugling, Nutzen ziehen läßt.

Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf einige Alkaloidsalze und Farbstoffe.

Von

Helene Tschernorutzky.

(Aus der Technischen Hochschule, Charlottenburg.)

(Eingegangen am 19. August 1912.)

In Fortsetzung der von Prof. J. Traube in dieser Zeitschrift veröffentlichten Versuche: „Über die Wirkung von Basen und basischen Salzen auf Alkaloidsalze" (diese Zeitschr. 42, 470), sowie „Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf basische Farbstoffe und deren Giftigkeit" (diese Zeitschr. 42, 496), wurden von mir sowohl mit Hilfe der stalagmometrischen Methode wie durch Kaulquappenversuche eine Anzahl ergänzender und erweiternder Versuche ausgeführt, deren Ergebnisse in den folgenden Tabellen mitgeteilt werden.

Die Versuche wurden mit demselben Stalagmometer ausgeführt, welches von Traube benutzt wurde und bei 20° für Wasser die Tropfenzahl gleich 49,95 ergab, so daß also meine Versuchsergebnisse mit denjenigen von Traube direkt vergleichbar sind.

Versuche mit Physostigmin- und Pilocarpinchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1% Physostigminchlorhydrat	n. 1 Std. 20 Min. schw. Zuckungen	51,4
10 „ dest. Wasser + 1 ccm 1% Physost.-HCl	n. 24 Std. sehr munter	50,2
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 30 Min. tot	51,9
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ -HCl + 0,3 ccm 1% Na_2CO_3	n. 15 Min. tot	54,3
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ -HCl + 0,5 ccm 1% Na_2CO_3	n. 10 Min. tot	54,9

	Kaul-quappen	Stalagm. Tropfen-zahl
10 ccm 1% Pilocarpinchlorhydrat	n. 24 Std. lebend	51,2
10 „ 1 „ „ -HCl + 1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 2 1/2 Std. sehr munter	53,5
10 „ dest. Wasser + 1 ccm 1% Piloc.-HCl	n. 24 Std. sehr munter	50,2
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 4 Std. sehr munter	50,4
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,3 ccm 1% Na_2CO_3	n. 4 Std. sehr munter	50,7
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,5 ccm 1% Na_2CO_3	n. 4 Std. sehr munter	50,9
10 „ „ „ + 5 „ 1 „ „ „ + 0,5 ccm 1% Na_2CO_3	n. 4 Std. sehr munter	51,2

Meine Versuche mit Physostigminchlorhydrat und Pilocarpinchlorhydrat stehen, soweit sie sich auf die Messung der Oberflächenspannung beziehen, in vollem Einklang mit den Zahlen, die bereits von Traube nach dieser Richtung veröffentlicht wurden. Kaulquappenversuche wurden von Traube nur vereinzelt ausgeführt, um die antagonistische Wirkung von Pilocarpin und Atropin auch am Tierexperiment zu zeigen.

Meine Kaulquappenversuche zeigen nun die vollste Übereinstimmung mit den stalagmometrischen Ergebnissen. In dem Maße wie durch Zusatz von Natriumcarbonat die Tropfenzahl wächst, wird auch die Lösung giftiger.

Es zeigt sich ferner, übereinstimmend mit der Erfahrung, daß Pilocarpin an sich wesentlich ungiftiger ist als Physostigmin, daß dementsprechend auch die gleiche Menge Natriumcarbonatzusatz bei Physostigminchlorhydrat größere Tropfenausschläge sowie eine größere Steigerung der Giftwirkung herbeiführt, als bei Pilocarpinchlorhydrat.

Diese Tatsache ist von Bedeutung in Hinsicht auf die von Traube gegebene Theorie der lokalen Wirkung der Alkaloide.

Traube hat durch stalagmometrische und Kaulquappenversuche die Erfahrung tatsächlich bestätigt, daß durch Pilocarpinzusatz zu Atropin eine Entgiftung dieses Alkaloides und von dessen Salzen eintritt. Bei Physostigmin- und Pilocarpingemischen ist ein solcher Antagonismus nicht bekannt, und dementsprechend fand ich auch durch einige mit solchen Gemischen vorgenommene Kaulquappenversuche, daß in der Tat

die Kaulquappen in den Gemischen von 10 ccm dest. Wasser + 1 %iger Physostigminchlorhydratlösung + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3 + 1 ccm 1 %ige Pilocarpinchlorhydratlösung fast ebenso lange (10 bis 11 Min.) lebten wie in Physostigminlösung allein.

Diese Feststellung ist um so mehr hervorzuheben, als die stalagmometrischen Tropfenausschläge für Physostigminchlorhydratlösungen bei Zusatz von Natriumcarbonat größer sind, als für gleich konzentrierte Atropinsulfatlösungen.

Versuche mit Veratrinchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1 % Veratrinchlorhydrat	n. 6 Min. tot	59,4
10 „ 1 „ „ + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3	Niederschlag	
20 „ dest. Wasser + 1 ccm 1 % Veratrin-HCl	n. 1½ Std. nur Zuckungen	50,6
20 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 7 Min. tot	63,9
20 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,2 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 2 Min. tot	67,1

Das Veratrin ist (nach Fränkels „Arzneimittel-Synthese") eines der stärksten Starrkrampfgifte. Diesem Befunde entspricht einerseits die sehr hohe Tropfenzahl der 1 %igen Lösung von Veratrinchlorhydrat und deren große Giftwirkung auf Kaulquappen. Andererseits zeigt sich auch hier wiederum ein entsprechend großer Tropfenausschlag bei Zusatz von Natriumcarbonat und eine dementsprechend erhebliche Zunahme der Giftwirkung gegen Kaulquappen.

Versuche mit Hydrastin- und Hydrastininchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1 % Hydrastinchlorhydrat	n. 1 Std. tot	51,1
10 „ 1 % Hydrastin-HCl + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3	Niederschlag	
10 „ dest. Wasser + 1 ccm 1 % Hydrastin-HCl	n. 3 Std. tot	50,3
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 13 Min. tot	53,7
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,2 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 5 Min. tot	56,4
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3	Niederschlag	

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1 % Hydrastininchlorhydrat	n. 70 Min. tot	50,2
10 „ 1 „ „ + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 15 Min. tot	51,4
10 „ dest. Wasser + 1 ccm 1 % Hydrastinin-HCl	n. 24 Std. lebend	50,0
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ „ + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 8 Std. tot	50,2

Nach Fränkels „Arzneimittel-Synthese" sind Hydrastin und Hydrastinin zwar beides giftige Alkaloide, indessen ist das Hydrastin doch wesentlich giftiger als das Hydrastinin. Hiermit in vollem Einklang stehen meine Versuchsergebnisse. Die Tropfenausschläge bei Hydrastin sind sehr groß, bei Hydrastinin minimal. Während in einer Lösung von 10 ccm Wasser + 1 ccm 1 % Hydrastinchlorhydrat + 0,2 ccm 1 % Na_2CO_3 die Kaulquappen schon in ca. 5 Minuten bewegungslos waren, lebten dieselben in einer Lösung von 10 ccm Wasser + 1 ccm 1 % Hydrastininchlorhydrat + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3 noch 3 Stunden.

Von dem (nach Fränkels „Arzneimittel-Synthese") sehr ungiftigen Narcein konnte nur eine etwa 0,02 % enthaltende gesättigte Narceinlösung untersucht werden.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm gesätt. Narceinlösung	n. 24 Std. lebend	51,8
10 „ „ „ + 1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 24 Std. lebend	52,0

Die Versuche bestätigen die Ungiftigkeit dieses schwerlöslichen Alkaloids.

Versuche mit Narkotinchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1 % Narkotinchlorhydrat	n. 35 Min. tot	53,0
10 „ 1 „ „	n. 8 Std. bewegungslos	50,4
10 „ 0,1 „ Narkotin-HCl + 0,1 ccm 1 % Na_2CO_3	Niederschlag	
10 „ 0,02 „ „ „ + 0,1 „ 1 „ „	„	

Meine Versuche mit Narkotinchlorhydrat führten ebenfalls in Übereinstimmung mit den Erfahrungen (siehe Fränkel, l. c.) zu der Tatsache, daß dieses Alkaloid nicht sehr giftig ist, allerdings für Kaulquappen giftiger als Morphinchlorhydrat[1]).

Versuche mit Berberinchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm Berberinchlorhydrat 0,1 %	n. 5 Std. sehr beweglich	50,6
10 „ 0,1 % Berberinchlorhydratlsg. + 0,1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 4 Std. tot	50,8
10 „ 0,1 „ „ + 0,5 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 35 Min. tot	51,0
10 „ 0,1 „ „ + 1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 10 Min. tot	51,1

Die stalagmometrischen Versuche mit Lösungen von Berberinchlorhydrat stehen insofern in einem gewissen Gegensatz zu den Kaulquappenversuchen, als nach letzteren die Giftigkeit des Berberins größer erscheint, als auf Grund der Tropfenausschläge. Indessen da durch Zusatz von Natriumcarbonat zu der Berberinchlorhydratlösung die anfangs hellgelbe Lösung eine dunkelbraunrote Färbung annimmt, so dürften hierbei wohl irgendwelche chemische Änderungen in Betracht kommen.

Versuche mit Hydrochinin- und Chininchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 0,1 % Hydrochininchlorhydrat	n. 3 1/2 Std. sehr beweglich	51,6
10 „ 0,1 „ „ + 0,1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 8 Min. letzte Zuckg.	66,0
10 „ 0,1 „ „ + 0,5 „ 1 „ „	Niederschlag	
10 „ 0,1 „ Chininchlorhydrat	n. 7 Std. sehr beweglich	50,6
10 „ 0,1 „ „ + 0,1 ccm 1 % Na_2CO_3	n. 16 Min. letzte Zuckg.	62,2
10 „ 0,1 „ „ + 0,5 „ 1 „ „	Niederschlag	

---

[1]) Vgl. Traube, Über die Wirkung von Basen und basischen Salzen auf Alkaloidsalze. Diese Zeitschr. 42, 491.

Das Hydrochininchlorhydrat (welches gütigst von der Firma Merck zur Verfügung gestellt wurde) ist (nach Fränkels „Arzneimittel-Synthese“) ein sehr giftiger Körper. Es erwies sich in der Tat sowohl nach der Methode der Oberflächenspannungbestimmung wie durch Kaulquappenversuche nicht unwesentlich giftiger als Chininchlorhydrat.

Versuche mit Strychninnitrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1% Strychninnitrat	n. $2^1/_2$ Min. tot	51,4
10 „ 1 „ „ + 0,1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 2 Min. tot	51,8
10 „ 1 „ „ + 0,5 „ 1 „ „	Niederschlag	
10 ccm dest. Wasser + 1 ccm 1% Strychninnitrat	n. 15 Min. tot	51,2
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 0,1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 11 Min. tot	51,3
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 0,5 ccm	Niederschlag	

Strychninnitrat ist, wie die Versuche mit Kaulquappen ergeben, zweifellos gegen diese Kaltblüter ein außerordentlich starkes Gift. Hiermit im Widerspruch stehen anscheinend die stalagmometrischen Versuche; indessen folgt einerseits aus der Arbeit von Traube[1]), daß erst ein gewisser Schwellenwert des Zusatzes von Natriumcarbonat erforderlich ist, um eine ansteigende Tropfenzahl hervorzubringen, dieser Schwellenwert aber konnte hier wegen der Niederschlagsbildung nicht überschritten werden; andererseits hat Traube bei seinen Untersuchungen mit verschiedenen Chininsalzen[2]) festgestellt, daß das Chininnitrat mehr als 4 mal so giftig war als die übrigen untersuchten Chininsalze (Chlorid, Jodid, Valerianat, Acetat).

Es wären also weitere Strychninsalze zu untersuchen und zu prüfen, ob nicht die Salpetersäure an der Giftwirkung mitbeteiligt ist.

---

[1]) Traube, Über die Wirkung von Basen und basischen Salzen auf Alkaloidsalze. Diese Zeitschr. 42, 481.

[2]) Vgl. l. c. S. 480.

Versuche mit Kodeinchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1% Kodeinchlorhydrat	n. 1½ Std. Zuckungen	54,0
10 „ 1 „ „ + 1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 12 Min. tot	60,4
10 ccm dest. Wasser + 1 ccm 1% CodHCl	n. 4 Std. nur Zuckungen	52,4
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 0,1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 60 Min. Zuckg.	52,8
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 0,5 ccm 1% Na_2CO_3	n. 28 Min. Zuckg. n. 1 St. 45 Min. tot	53,0
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 25 Min. Zuckg. n. 1 St. 25 Min. tot	53,4

Die Versuche mit Kodeinchlorhydrat bestätigten das, was (siehe Fränkel, l. c.) über die Giftigkeit dieses Alkaloids gesagt wurde. Die Kaulquappenversuche zeigen die starke tetanische Wirkung, und die stalagmometrischen Versuche stehen in gutem Einklang mit den Tierversuchen. Das Kodeinchlorhydrat hat gegenüber den Kaulquappen eine mittlere Giftigkeit.

Versuche mit Coniinchlorhydrat.

	Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1% Coniinchlorhydrat	n. 1 St. nur Zuckungen	51,7
10 „ 1 „ „ + 1 ccm 1% Na_2CO_3	n. 1½ Min. tot	57,6
10 ccm dest. Wasser + 1 ccm 1% Coniin-HCl	n. 5½ Std. beweglich	50,6
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 0,2 ccm 1% Na_2CO_3	n. 15 Min. tot	52,1
10 „ „ „ + 1 „ 1 „ „ + 0,5 ccm 1% Na_2CO_3	n. 6 Min. tot	52,6

Die Versuche mit Coniinchlorhydrat bestätigen die Giftigkeit dieses Alkaloids und zeigen eine gute Übereinstimmung der stalagmometrischen Ergebnisse mit den Versuchen an Kaulquappen.

Im Anschluß an die obenerwähnte vorläufige Arbeit von Traube: Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf basische Farbstoffe und deren Giftigkeit (diese Zeitschr. 42, 496) wurden von mir die folgenden stalagmometrischen und Kaulquappenversuche an einigen weiteren basischen wie auch sauren Farbstoffen ausgeführt.

Farbstoff	Konzentr. d. Farbstofflösung %	Anzahl ccm der Farbstofflösungen	Zuges. Menge 1%iger Na_2CO_3-Lösg. ccm	Stalagm. Tropfenzahl (Wasser = 49,9 Tr.)	Verhalten der Kaulquappen
Methylenviolett	0,1	—	—	52,0	n. 30 Min. tot
„	0,1	20	0,4	53,3	„ 11 „ letzte Zuckungen
Methylgrün	0,1	—	—	50,0	„ 1 Std. 50 Min. tot
„	0,1	20	0,4	50,8	„ 1 „ 30 „ „
Methylengrün	0,1	—	—	50,0	„ 41 „ tot
„	0,1	20	0,4	50,8	„ 25 „ „
Chrysanilin	0,1	—	—	51,8	„ 1 Std. 10 Min. tot
„	0,1	20	0,1	52,7	„ 1 „ tot
„	0,1	20	0,4	—	Niederschlag
Chrysoidin	0,1	—	—	50,6	„ 11 Min. tot
„	0,1	20	0,1	56,3	„ 10 „ „
„	0,1	20	0,4	—	Niederschlag
Bismarckbraun	0,1	—	—	50,0	„ 55 Min. tot
„	0,1	20	0,4	—	Niederschlag
Eosin	0,1	—	—	50;2	„ 2 Tagen lebend
„	0,1	20	0,4	50,5	„ 8 Std. „
Indigocarmin	0,1	—	—	50,2	„ 2 Tagen „
„	0,1	20	0,2	50,5	„ 2 „ „
„	0,1	20	0,4	50,6	„ 6 Std. „
Rose bengale	0,1	—	—	50,1	„ 1 Std. 50 Min. tot
„	0,1	20	0,2	50,2	„ 1 „ 55 „ „
Echtrot	0,1	—	—	50,1	„ 2 Tagen lebend
„	0,1	20	0,4	50,1	„ 2 „ „
Wollviolett	0,1	—	—	53,0	„ 1 Tage „
„	0,1	20	0,4	52,9	„ 2 Std. 45 Min. tot
Pikrinsäure	0,1	—	—	50,4	sofort Zuck.; nach 18 Min. tot
„	0,1	20	0,4	50,3	n. 50 Min. tot

Das Versuchsmaterial ist auch noch viel zu gering, um allgemeine Schlüsse zuzulassen.

Die Versuche an basischen Farbstoffen bestätigen im wesentlichen die Bemerkung von Traube, daß hier bei den kolloidaleren Farbstoffen die Verhältnisse wesentlich verwickelter sind als bei den nicht kolloidalen oder weniger kolloidalen Alkaloiden. Eine Parallelität von stalagmometrischen und Kaulquappenversuchen besteht nicht. Die Regel von Traube, wonach basische Farbstoffe, welche die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigen, meist gegen Kaulquappen giftiger sind als solche,

die keine Erniedrigung der Oberflächenspannung erwirken, wird durch meine wenigen Versuche weder bestätigt noch widerlegt. Dagegen scheint die Bemerkung Traubes, daß die Giftigkeit namentlich von solchen Farbstoffen, die an sich relativ ungiftig sind, durch Zusatz von Natriumcarbonat verstärkt wird, sich insoforn zu bestätigen, als bei den relativ ungiftigen Methylengrün und Bismarckbraun in der Tat jene Verstärkung beobachtet wurde, während im Gegensatz hierzu bei dem (gegen Kaulquappen) wesentlich giftigeren Chrysoidin, im Einklang mit Traubes Versuchen, der Zusatz von Natriumcarbonat keine Verstärkung der Giftwirkung herbeiführte.

Versuche an sauren Farbstoffen sind von Traube nicht angestellt worden.

Meine diesbezüglichen Versuche mit Eosin, Indigokarmin, Rose bengale und Echtrot zeigen zunächst, daß diese Farbstoffe die Oberflächenspannung des Wassers so gut wie nicht beeinflußt, und daß ebenso diese Farbstofflösungen für die Kaulquappen recht ungiftig sind. Diese Ungiftigkeit bleibt auch für das Wollviolett bestehen, obwohl hier ein Einfluß auf die Oberflächenspannung vorhanden ist. Daß die saure Pikrinsäure Giftwirkungen ausübt, ist nicht weiter auffallend.

Leider mußte diese Arbeit zurzeit abgebrochen werden.

Es liegen zahlreiche Untersuchungen von Farbstofflösungen von seiten anderer Forscher vor in bezug auf das vitale Färbungsvermögen, den Suspensions- oder Emulsionscharakter, sowie die Teilchengröße der gelösten Farbstoffe, ihre osmotische Fähigkeit usw. Leider fehlen aber in allen diesen Fällen die Messungen der Oberflächenspannung.

Es würde eine lohnende Aufgabe sein, die betreffenden, zum Teil wertvollen Untersuchungen nach dieser Richtung zu ergänzen; denn sicherlich ist die Oberflächenspannung einer der Faktoren, welcher bei derartigen Untersuchungen nicht unberücksichtigt bleiben darf.

Über das Verhalten der Stärke unter dem Einfluß der stillen Entladung.

Von

Walther Löb.

(Aus der biochemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 19. August 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Nach der Beobachtung von Rosenthal[1]) wird Stärke durch elektromagnetische Schwingungen hydrolysiert. Die Beeinflussung von Enzymwirkungen durch verschiedenartige Strahlen ist von mehreren Seiten[2]) festgestellt. Es schien mir deshalb von Interesse, die Wirkung der stillen Entladung auf Stärke und Eiweißkörper zu untersuchen. Die durch die Entladung zugeführte Energie, die bekanntlich in der Form ultravioletter und Kathodenstrahlen wirksam ist, konnte Reaktionen veranlassen, die den Enzymreaktionen entsprechen. Für die Stärke wurde diese Ansicht durch den Versuch bestätigt, während die Wirkung auf Seidenpepton, das als Vertreter der Eiweißkörper untersucht wurde, zu unbedeutend war, um eine sichere Entscheidung zu gestatten. An einer geringen Menge verdünnter Stärkelösung läßt sich hingegen in kurzer Zeit vollständige Verzuckerung herbeiführen, wenn man die Entladung im Vakuum auf die Lösung einwirken läßt.

Durch dieses Ergebnis wird aufs neue der Parallelismus zwischen der Wirkung ultravioletter Strahlen und derjenigen der stillen Entladung deutlich.

---

[1]) Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. **20.** Berlin 1908.

[2]) J. B. Agulhon, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **152**, 398, 1911.

Massol[1]), sowie Bielecki und Wurmser[2]) haben neuerdings durch Bestrahlung von Stärkelösungen bei 45° neben Oxydationen Spaltungen beobachtet, wobei Dextrine, Zuckerarten, Formaldehyd und saure Körper auftraten. Inversion von Disacchariden und Hydrolyse von Polysacchariden hatte Neuberg[3]) durch Sonnenstrahlung und die Strahlen der Finsen- und Quarzlampe in Gegenwart von Eisen- und Uransalzen bereits vor mehreren Jahren beobachtet.

Experimentelles.

Das auch für andere Reaktionen bewährte Entladungsgefäß hatte die folgende, durch nebenstehende Skizze (Fig. 1) veranschaulichte Einrichtung.

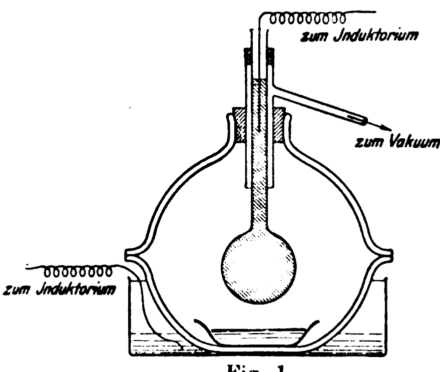


Fig. 1.

In eine größere Glasschale, deren Boden mit Kochsalzlösung bedeckt ist, wird ein Exsiccatorgefäß gesetzt, dessen unterer Teil aus Porzellan besteht, während die obere Hälfte durch eine Glashalbkugel mit einer an ihrem höchsten Teile befindlichen Öffnung gebildet ist. Die beiden Teile sind in der bei Vakuumexsiccatoren üblichen Weise aufeinander geschliffen. Durch die in der oberen Hälfte befindliche Öffnung ist mittels eines einfach durchbohrten Gummistopfens der abgesprengte Hals eines Fraktionierkolbens mit dem seitlichen Ansatz zum Anschluß an die Vakuumpumpe geführt. Durch den Hals des Fraktionierkolbens wird mit einem Gummistopfen oder einem Gummischlauch ein Glasrohr luftdicht so hindurchgesteckt, daß das Glasrohr

---

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **152**, 902, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. **48**, 154, 1912. Vgl. auch Euler und Ohlsen, Über die Inversion des Rohrzuckers durch ultraviolette Strahlen. Journ. d. Chim. phys. **9**, 416, 1911.

[3]) Diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **29**, 279, 1910.

noch einige Zentimeter über den Kolbenhals hinausragt. Etwa 3 cm über dem Porzellanboden erweitert sich das Glasrohr zu einer Kugel von etwa 3,5 cm Durchmesser. Die Glaskugel und ein Teil des Glasrohres werden mit Kochsalz gefüllt, in die ein starker Metalldraht ragt, der den Anschluß an das Induktorium vermittelt. Als zweite Elektrode, die gleichfalls durch einen Draht mit dem Induktorium verbunden ist, dient die Kochsalzlösung der äußeren Glasschale. Die der Einwirkung der Entladung auszusetzende Flüssigkeit wird entweder direkt in die Porzellanschale gebracht oder in ein kleines dünnwandiges Glasgefäß, falls die Flüssigkeitsmenge zu gering ist, um den Boden des Entladungsgefäßes zu bedecken.

Bei einem Vakuum von 18 bis 20 mm Quecksilber, zu dessen Erreichung eine gut wirkende Wasserstrahlluftpumpe ausreicht, und geeigneten Strombedingungen erstrahlt der Raum zwischen Glaskugel und Porzellanboden in schwachem, nur im Dunkeln sichtbarem, gleichmäßigem, bläulichem Licht ohne Funkenbildung.

Als Stromquelle diente die 110-Volt-Leitung, die sowohl den Motor eines von der Berliner Elektrizitätsgesellschaft Sanitas gelieferten Rotaxunterbrechers betrieb, als auch den Primärstrom eines großen Induktoriums mit 25 cm maximaler Funkenlänge lieferte.

Widerstände gestatteten, die Umdrehungszahl des Motors und damit die Unterbrechungsgeschwindigkeit und die Stärke des Primärstromes zu variieren und regulieren. Die Einstellung war so gewählt, daß der Motor das Maximum der Umdrehungszahl, der Unterbrecher das Maximum der Unterbrechungsgeschwindigkeit aufwies bei einem Primärstrom von 1 bis 1,5 Amp.

Die Wirkung der Entladung geht aus folgenden Versuchsdaten hervor.

1. 1 ccm 1%ige Stärkelösung zeigt nach $2^1/_4$stündiger Einwirkung mit Jodlösung nur eine schwache Gelbfärbung. Osazonbildung reichlich. Fehlingsche Lösung wird stark reduziert.

2. 0,5 g Stärke in 3 ccm Wasser zeigt nach 4 Stunden zwar noch blaue Jodreaktion; jedoch hat die Flüssigkeit bereits stark reduzierende Eigenschaft erhalten und gibt mit Phenylhydrazin reichlich Osazon.

3. 10 ccm 1‰ige Stärkelösung geben nach $3^1/_2$stündiger Einwirkung keine Jodreaktion mehr. Reduktion und Osazonbildung vorhanden.

Alle Versuche wurden mit Kontrollen angestellt, an denen die fortschreitende Einwirkung der Entladung bei in $^1/_4$stündigen Pausen entnommenen Proben deutlich sichtbar ist.

Beiläufig seien hier noch einige Versuche bemerkt, die in dem beschriebenen Apparat ausgeführt wurden.

1. Alkoholisches Ammoniak unter den erwähnten Strombedingungen der Entladung ausgesetzt, wobei nach Herstellung eines Vakuums von 30 mm der Elektrisator geschlossen blieb, liefert nach $3^{1}/_{2}$ stündiger Versuchsdauer Krystalle. Nach Entfernung des Alkohols und Ammoniaks hinterbleibt ein Gemisch von Hexamethylentetramin und ameisensaurem Ammonium[1]).

2. Leitet man in den mit 15 ccm Wasser versetzten Elektrisator aus einer Bombe Kohlensäure ein und hält nach Entfernung der Luft den Kohlensäureüberdruck auf etwa 50 mm Quecksilber, so ist nach 3stündiger Wirkung der Entladung Formaldehyd deutlich nachweisbar, während Ozongeruch die eingetretene Spaltung der Kohlensäure anzeigt[2]).

---

[1]) Vgl. Löb, Zeitschr. f. Elektrochemie **12**, 282, 1906 und diese Zeitschr. **20**, 136, 1909.

[2]) Vgl. Zeitschr. f. Elektrochemie **12**, 282, 1906.

Einige Beobachtungen über die Pankreasdiastase.

Von

Walther Löb.

(Aus der biochemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 19. August 1912.)

Bei der großen Rolle, die die Pankreasdiastase im Stoffwechsel des tierischen Organismus spielt, erschien es mir nicht ausgeschlossen, daß für die Frage der Isolierung eines Enzyms diese Diastase ein geeignetes Material bilden könne. Trotz vielfacher Versuche ist es mir aber nicht gelungen, dieses Ziel zu erreichen. Es wurden jedoch bei diesen Untersuchungen einige Beobachtungen gemacht, die, anscheinend abseits des bearbeiteten Problems liegend, doch nach manchen Richtungen hin von Interesse sein dürften. Um den Zusammenhang der diastatischen Wirkung mit der Glykolyse des Zuckers zu prüfen, suchte ich festzustellen, ob die Sonderstellung, die die Phosphate bei vielen Abbaureaktionen des Traubenzuckers einnehmen, auch bei der diastatischen Zersetzung der Stärke zu Zucker in Erscheinung tritt, und ferner, in welcher Weise die oxydative Zerstörung des Zuckers sich unmittelbar an die Diastasewirkung auf Stärke anschließt. Weitere Versuche, ob mittels der Pankreasdiastase innerhalb der Zuckergruppe synthetische Vorgänge erzielbar sind, lieferten ausnahmslos negative Resultate, so daß ich mich auf diese Erwähnung beschränke. Bevor ich auf die Mitteilung der in den eben erwähnten Punkten erhaltenen Resultate eingehe, möchte ich kurz einige Beobachtungen allgemeinerer Art vorausschicken.

Über den Gehalt des Schweinepankreas an Diastase.

Zu allen Versuchen diente mir die entblutete und bei niedriger Temperatur getrocknete Gesamtmasse der Drüsen, die durch Behandlung in der Kugelmühle in ein gröberes Pulver

übergeführt waren. In diesem Pulver sind natürlich alle Enzyme des käuflichen Pankreatins enthalten. Bei der Feststellung des diastatischen Wirkungsgrades handelt es sich nur um relative Ermittlungen, wobei zu berücksichtigen ist, daß wir über das Vorkommen von Hemmungskörpern bezüglich der gerade untersuchten Reaktion nicht unterrichtet sind. Jedoch bietet das auch schon für andere Organe angewandte Wohlgemuthsche Verfahren[1]) immerhin die Möglichkeit, vergleichbare Werte zu ermitteln.

Bereits Ehrmann und Wohlgemuth selbst haben festgestellt, daß die Diastasemengen des Pankreas ungemein hoch sind. Sie geben an[2]), daß, wenn man Hundepankreas mit der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verreibt, kurze Zeit unter Toluol stehen läßt und dann in dem klar filtrierten Extrakt die Diastasemenge bestimmt, man Werte erhält, die die des Serums von dem gleichen Tiere um das 600 bis 700fache übertreffen. Wird die Diastasemenge des Serums auf rund 200 angenommen, so würden sich Zahlen bis zu 140000 ergeben. Der für das Schweinepankreas ermittelte Wert gehört der gleichen Größenordnung an. Zur Ausführung des Versuches wurde 1 g Pankreaspulver mit 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung eine Stunde geschüttelt und die Mischung nach dem Zentrifugieren filtriert. Von dem Filtrat wurden 10 ccm auf 100 verdünnt und die Verzuckerungsversuche in der von Wohlgemuth angegebenen Anordnung angesetzt. Es zeigte sich, daß 0,15 ccm in 24 Stunden 5 ccm einer 1%igen Stärkelösung vollständig verzuckern, woraus sich unter Berücksichtigung der Beobachtung, daß das Gramm Pulver etwa 1 ccm Volumen einnimmt, der Wert $D_{37^\circ}^{24\,\mathrm{Std.}} = 215000$ berechnet.

Versuche zur Isolierung der Diastase.

Obgleich die Reindarstellung der Diastase bis jetzt noch nicht geglückt ist und bei unserem Mangel an Kenntnissen über die chemische Natur der Diastase augenblicklich als ein schwer erreichbares Ziel erscheint, so liegt es doch nahe, die leicht zu ermittelnden Löslichkeitseigenschaften der Diastase zu benutzen, um einen Teil der sie begleitenden Stoffe von ihr zu trennen.

---

[1]) Diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

[2]) Vgl. Ehrmann und Wohlgemuth, diese Zeitschr. 21, 427, 1909.

Es handelt sich dabei hauptsächlich um Eiweißstoffe und deren nächste Abkömmlinge, sowie um andere Enzyme, deren ausgeprägtestes das Trypsin ist. Die Gegenwart des letzteren gibt die Möglichkeit, seine Wirkung durch eine Art Autolyse zur teilweisen Abscheidung von Eiweißspaltprodukten zu benutzen, nachdem festgestellt war, daß die tryptische Verdauung die Wirkung der Diastase nicht beeinträchtigt. Es zeigte sich ferner, daß die Diastase in 50%igem Alkohol unlöslich ist, ebenso in Äther. Die aus dieser Tatsache ermöglichte weitere Fraktionierung fand aber darin ihre Grenze, daß gerade das Trypsin dieselben Löslichkeitsverhältnisse zeigt und mit der Diastase vergesellschaftet blieb. Es stand noch der weitere Weg offen, nach dem Vorschlag von Michaelis[1]) eine Trennung durch Ausflockung eines Enzyms bei der für diese optimalen Ionenkonzentration zu versuchen. Nach einigen vergeblichen Vorversuchen wurde aber die Arbeit in dieser Richtung abgebrochen, ohne daß über die Gangbarkeit dieses Weges ein entscheidendes Urteil gewonnen wurde.

Im einzelnen verfuhr ich wie folgt:

50 g Pankreaspulver wurden in 300 ccm destilliertem Wasser eine Stunde auf der Maschine geschüttelt und das Gemisch auf der elektrischen Zentrifuge zentrifugiert. Nach Abheben einer dünnen Fettschicht von der Oberfläche ließ sich die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit durch ein Faltenfilter filtrieren. Das Filtrat, durch eine sterile Chamberlainkerze nochmals filtriert, bildete eine klare gelbe Lösung von saurer Reaktion. Sie wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht und mit einem Volumprozent Toluol 8 Tage im Brutschrank der Selbstverdauung überlassen. Nach dieser Zeit hat sich ein reichlicher Niederschlag gebildet, der viel Tyrosin enthält. Nach Zusatz von etwas Essigsäure bis zur sauren Reaktion und längerem Stehen in der Kälte wird filtriert und das Filtrat mit der gleichen Menge absolutem Alkohol versetzt. Es fällt hierbei ein weißer, flockiger Niederschlag aus, der auf dem Filter gesammelt und mit verdünntem Alkohol, absolutem Alkohol und Äther gründlich ausgewaschen wird. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, resultiert ein weißes Pulver, das die Biuretreaktion

---

[1]) Michaelis und Davidsohn, diese Zeitschr. 30, 481, 1911.

und Millonsche Reaktion nur schwach aufweist und eine ausgeprägte diastatische und tryptische Wirksamkeit besitzt. Aus 50 g Pankreaspulver wurden etwa 2 g dieser Substanz gewonnen. Aus dem alkoholischen Filtrat der Fällung ließ sich durch Äther eine weitere weiße Fällung erzielen, die die Millonsche und Biuretreaktion ausgeprägt aufwies, aber keine Enzymwirkungen mehr zeigte. Ich benutzte das durch die einfache Alkoholfällung auf diese Art hergestellte Pulver, um das Verhalten der Diastase gegenüber Phosphaten zu untersuchen.

Über den Einfluß der Phosphate auf die Diastasewirkung.

Das Ergebnis dieser Versuche ist die Feststellung, daß anorganische Phosphate die Diastasewirkung ganz erheblich zu beschleunigen vermögen, daß aber eine allzu reichliche Menge der Phosphate hemmend wirkt. Wohlgemuth[1]) hat nur eine hemmende Wirkung des Natriumphosphats beobachtet.

Für die Versuche wurde eine Lösung hergestellt, die einen Teil des mit Alkohol gefällten Enzympulvers in 500 Teilen Wasser enthielt. Diese Lösung zeigte noch so starke diastatische Wirkungen, daß zur Ausführung der Prüfungen nach der Wohlgemuthschen Vorschrift eine nochmalige 10fache Verdünnung notwendig war. Dieselbe wurde so ausgeführt, daß einmal 10 ccm mit Wasser direkt auf 100 gebracht wurden, das zweite Mal 10 ccm mit 10 ccm des Michaelisschen Phosphatgemisches versetzt und das Volumen auf 100 ccm ergänzt wurde. Nach 24 Stunden in der gewöhnlichen Anordnung lag die Grenze der Diastasewirkung bei Fehlen der Phosphate bei 1 ccm, während in Gegenwart der Phosphate bereits 0,12 ccm ausreichten, um eine vollständige Verzuckerung herbeizuführen. Die Diastasewirkung war demnach durch den Phosphatzusatz auf nahezu den 10fachen Betrag gesteigert worden.

Wird aber der Phosphatzusatz auf das 3fache erhöht, so daß auf 10 ccm der ursprünglichen Diastaselösung 30 ccm Phosphatgemisch und 60 ccm Wasser kommen, so ist bereits eine Hemmung gegenüber der phosphatfreien Lösung vorhanden. Es gelingt dann nicht mehr, selbst nicht in 3 Tagen, mit 1 ccm der Flüssigkeit 5 ccm Stärkelösung zu verzuckern. Nach dieser

---

[1]) Diese Zeitschr. 9, 21, 1908.

Feststellung der Phosphatwirkung ist es klar, **daß den Diastasewerten nur eine relative Bedeutung zukommen kann, wenn man nicht über die Gegenwart hemmender oder fördernder Substanzen in der zu untersuchenden Flüssigkeit** genau unterrichtet ist.

Um zu erfahren, ob die diastatische Wirkung im Reagensglase mit der oxydativen Glykolyse in einen Zusammenhang gebracht werden kann, war es bei Berücksichtigung der früher von mir angewandten Methode erforderlich, festzustellen, wie sich die Diastasewirkung gegenüber Wasserstoffperoxyd verhält. Das Resultat war, daß die Gegenwart des Peroxyds die Diastasewirkung aufhebt, und zwar ebenso in Gegenwart von Phosphaten wie bei Fehlen derselben.

Dieser Befund gewann durch die Beobachtung an Interesse, daß die Stärke durch Wasserstoffperoxyd allein ohne Diastase hydrolysiert wird[1]), und zwar ist bei dieser Hydrolyse, die mit einer weiteren Oxydation der Spaltprodukte verknüpft ist, der Phosphatzusatz ebenso wie bei der Traubenzuckerglykolyse ein den Vorgang erheblich unterstützender Faktor. Ist hingegen gleichzeitig Diastase zugegen, so ist nicht nur, wie oben erwähnt, die Diastasewirkung durch das Peroxyd aufgehoben, sondern auch die Wirkung des Wasserstoffperoxyds und der Phosphate nahezu vollständig gehemmt. Trotz der reichlichen Gegenwart des Peroxyds am Schlusse des Versuches ist die Stärke fast völlig unverändert geblieben. Welcher Bestandteil in dem Enzympulver die Hemmung ausübt, ließ sich noch nicht ermitteln. In meiner Mitteilung über die Glykolyse unter dem Einflusse der Phosphate[2]) ist schon ausführlich die große Anzahl von Substanzen hervorgehoben worden, die die Phosphatwirkung aufheben oder vermindern. Daß es sich hier um einen ausgesprochenen Antagonismus gegen die Oxydation unter dem Einflusse der Phosphate handelt, zeigte sich, als ich die Traubenzuckeroxydation in Gegenwart von Phosphaten und des Diastasepulvers untersuchte. Auch hier war durch die äußerst geringe Substanzmenge, die mit der Diastaselösung dem Gemisch zugefügt wurde, die Oxydation vollständig aufgehoben.

[1]) Vgl. Neuberg und Miura, diese Zeitschr. **36**, 40, 1911; Gerber, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **154**, 1543, 1912.

[2]) Löb, diese Zeitschr. **32**, 43, 1911.

Es ist keine Frage, daß die beschleunigenden und hemmenden Einflüsse auf eine äußerst feine Regulation der Reaktionen hinweisen und noch eingehende Untersuchungen verdienen. Einige zahlenmäßige Ergebnisse der Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Der Zuckergehalt der Mischung vor der Digestion bei 37° betrug 0,67 %.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Nach 24stündiger Digestion			Bemerkungen
		Zuckergehalt	Reaktion	H_2O_2	
1	20 ccm Traubenzuckerlösung (5 %ig) 20 ccm Phosphatgemisch 100 ccm Wasserstoffperoxyd (3 %ig) 10 ccm Wasser	0,24 %	sauer	noch vorhanden	—
2	Dasselbe; statt der 10 ccm Wasser 10 ccm Diastaselösung 1:500	0,62 %	neutral	„	—
3	20 ccm Stärkelösung (5 %ig) 20 ccm Phosphatgemisch 100 ccm Wasserstoffperoxyd (3 %ig) 10 ccm Wasser	Jodreaktion verschwunden	sauer	„	Starke Reduktion Fehlingscher Lösung
4	Dasselbe; statt der 10 ccm Wasser 10 ccm Diastaselösung 1:500	tiefblau	neutral	„	Ganz geringe Nachreduktion

Schließlich sei noch erwähnt, daß von weiter untersuchten Zusätzen eine 1 %ige Formaldehydlösung die Diastasewirkung deutlich herabsetzt, während eine 10 %ige Lösung von oxymethylensulfonsaurem Natrium keine nachweisbare Schwächung der Diastase hervorruft.

Methodisches und Sachliches zur elektrometrischen Bestimmung der Blutalkalescenz.

Von

L. Michaelis und W. Davidoff.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban zu Berlin.)

(Eingegangen am 21. August 1912.)

Eine kritische Zusammenstellung der elektrometrischen Reaktionsmessungen am Blute ist erst kürzlich von Lundsgaard[1]) gegeben worden, so daß wir bezüglich der Literatur auf diese Arbeit verweisen können.

Nur eine Angabe in eigener Sache möchten wir aus dieser Arbeit berichtigen, die auf einem Mißverständnis beruht, zu dem Lundsgaard infolge einer ungenügenden Angabe unsererseits geführt wurde. Er gibt als Mittelwert für die von Michaelis und Rona gefundenen Werte von p_H im Serum die Zahl 7,91 an. Diese Zahl entspricht einer höheren Alkalität als die der anderen Autoren. Das beruht darauf, daß unsere Messungen damals an Seren angestellt wurden, die ohne Vermeidung von Kohlensäureverlust aus dem geronnenen Blut abgeschieden waren. In demjenigen Teile unserer Arbeit, der die Messungen am Serum beschreibt, hatten wir nicht die Absicht, die genuine Reaktion des Blutes zu bestimmen, sondern die Reaktion eines ohne besondere Vorsichtsmaßregeln abgesetzten Serums, wie man es z. B. für serologische Untersuchungen in die Hand bekommt. An diesem Serum sollte gezeigt werden, wie es selber reagiert und wie seine Reaktion sich mit der Temperatur und nach Zusatz von Säuren oder Laugen ändert. Daher, und nicht durch unsere abweichende Methode der Messung, kommen die Abweichungen. Unsere Messungen an frischem Blut, das ohne Kohlensäureverlust aufgefangen war, decken sich mit denen der anderen Autoren. Trotzdem soll das Unvollkommene der damaligen Methodik nicht abgeleugnet werden, nur sind die Fehler der Methode sehr viel kleiner, als Lundsgaard aus unseren Zahlen entnommen zu haben glaubt. Die

1) Diese Zeitschr. 41, 247, 1912.

eigene Erkenntnis von der verhältnismäßig schlechten Reproduzierbarkeit unserer Werte bei Messungen des Blutes, die im Gegensatz stand zu der guten Reproduzierbarkeit derselben bei anderen Flüssigkeiten, veranlaßte uns damals, die weiteren Messungen einzustellen und auf den höchsten Grad der Genauigkeit vorläufig zu verzichten. Das soll nunmehr nachgeholt werden.

Die Methode der elektrometrischen Messungen kohlensäurefreier Flüssigkeiten ist so ausgearbeitet worden, daß eine weitere Verbesserung kein Bedürfnis mehr ist. Anders steht es mit der Messung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten.

Das Verdienst, die Schwierigkeiten der Messung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten prinzipiell und praktisch zuerst überwunden zu haben, gebührt Hasselbalch[1]). Das Prinzip seiner Methode besteht darin, daß er die zu messende Flüssigkeit in einer Elektrode mit stehender Wasserstoffatmosphäre zuerst durch Schütteln in das Kohlensäuregleichgewicht setzt, dann die an Kohlensäure dadurch etwas verarmte Flüssigkeit bei bestehenbleibender Gasatmosphäre durch eine neue Probe der Flüssigkeit ersetzt. Wir haben mit einer Hasselbalchschen Elektrode gearbeitet, die nach der Vorschrift des Autors in Kopenhagen hergestellt war, und können die methodologischen Angaben dieses Autors bestätigen. Trotzdem konnten wir uns mit der Hasselbalchschen Methode nicht begnügen. Sie ist nicht einfach genug und erfordert zu viel Material, um eine Massenanwendung, ja selbst nur eine zur Kontrolle wünschenswerte Doppelmessung von menschlichem Blut zu ermöglichen, und eine solche ist durchaus erforderlich, wenn man zu allgemeingültigen Resultaten oder gar zu einer klinischen Anwendung der Methode kommen will. Es ist uns denn auch in der Tat gelungen, durch Anwendung unserer früheren gewöhnlichen Vorschrift durch einen ganz kleinen, dieser Hasselbalchschen Methode entnommenen Kunstgriff zu Resultaten zu gelangen, die in bezug auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Werte denen von Hasselbalch nicht nachstehen, obwohl die ganze Methode mit wesentlich einfacheren Apparaten auskommt. Die Methode soll zunächst in der Form beschrieben werden, wie sie für ungerinnbare Flüssigkeiten angewendet werden kann, also künstliche Carbonatlösungen, Serum u. dgl.

---

[1]) Diese Zeitschr. **30**, 317, 1911.

Als Elektrode benutzen wir die schon früher beschriebene, deren praktischste Form die l. c.[1]) abgebildete ist. Sie besteht aus einem spitzwinklig gebogenen Glasrohr mit beiderseits geschliffenen Öffnungen. In den einen Schliff paßt ein Glasstopfen hinein, der die Platinelektrode trägt. Als solche verwenden wir seit langem immer nur ein 1 cm langes Stück Platindraht. Der Draht wird auf die gewöhnliche Weise platiniert. Der Glasschliff wird durch eine Spur erwärmten Wachses mechanisch noch gefestigt. Die zu messende Flüssigkeit wird in das U-Rohr, das mit der Elektrode montiert ist, eingefüllt, dann mit Hilfe einer Glascapillare soviel Wasserstoff unter die Elektrode geleitet, daß der Platindraht noch knapp eintaucht. Nunmehr wird der andere Schenkel des U-Rohres mit der zu messenden Flüssigkeit vollkommen aufgefüllt, die offene Seite mit dem Finger verschlossen, und nun durch Hin- und Herkippen des U-Rohres die Wasserstoffblase 100 mal durch das ganze U-Rohr geschickt. Zum Schluß muß sich die Wasserstoffblase wieder auf der Seite der Elektrode befinden. Jetzt läßt man den verschließenden Finger los und verbindet mit Hilfe eines Gummischlauches, der durch eine Glasolive in das offene Ende des U-Rohres gesteckt wird und mit einem doppelt gelegten Baumwollfaden eingefädelt ist, die zu messende Flüssigkeit mit der Wanne mit gesättigter KCl-Lösung, die ihrerseits mit der ableitenden Elektrode in Verbindung steht.

Man erhält jetzt meist sofort bei der ersten Ablesung den richtigen Wert, höchstens ändert sich derselbe nach längerer Beobachtung noch um einige wenige Millivolt und bleibt dann für länger als 24 Stunden innerhalb eines Millivolts sicher konstant[2]).

---

[1]) Abderhaldens Handb. 5, 516, Fig. 131, oder Sörensen in Asher-Spiros Ergebnissen d. Physiol. 1912, S. 421, Fig. 4.

[2]) Der Umstand, daß häufig der anfänglich abgelesene Wert doch noch eine kleine nachträgliche Änderung erfährt, beruht wahrscheinlich nicht darauf, daß nach dem Schütteln das Gasgleichgewicht noch nicht erreicht ist, sondern darauf, daß geschüttelte Elektroden überhaupt oft unmittelbar nach dem Schütteln noch nicht ganz ihren definitiven Wert zeigen. Auch eine geschüttelte Kalomelelektrode zeigt oft einen um mehrere Millivolt falschen Wert, der nach einiger Zeit zu dem definitiven Ruhewert zurückkehrt. Bei Gaselektroden beschleunigt unsere Methode des knappen Eintauchens die Einstellung des Ruhewertes.

Tabelle I.

Beispiel für die Einstellung des Potentials bei einem künstlichen Carbonatgemisch.

Zeit	EMK umgerechnet gegen die Normalwasserstoffelektrode
sofort, um 11h 52′	0,415 Volt
11h 57′	0,418 „
12h 14′	0,418 „
12h 30′	0,418 „
12h 40′	0,419 „
1h 03′	0,419 „
1h 40′	0,418 „
1h 52′	0,418 „
am nächsten Tag	
11h	0,418 „

Der einzige Unterschied gegen die früherer Anwendungsweise dieser Elektrode ist der, daß die Wasserstoffblase durch Schütteln mit der Flüssigkeit ins Gleichgewicht gesetzt wird, daß sie also, bevor man die erste Ablesung macht, Kohlensäure bis zum Gleichgewicht aufgenommen hat, und daß die Flüssigkeit gleich mit Wasserstoffgas gesättigt wird. Wir werden sogleich durch Versuche beweisen, daß die der Flüssigkeit durch das Schütteln entzogene CO_2-Menge so gering ist, daß eine meßbare Abnahme der H-Ionen in der Flüssigkeit dadurch nicht eingetreten ist. Man wird nun fragen, warum das denn so ist, denn bei der Hasselbalchschen Elektrode ist die Zunahme der Alkalität nach dem Schütteln durch Entweichen von CO_2 recht merklich, und erst nach mehrmaligem Wechseln der Flüssigkeit erhält man einen konstanten, richtigen Wert. Die Ursache liegt in den Dimensionen unserer Elektrode. Unser gesamter Gasraum hat ein Volumen von allerhöchstens 0,6 ccm, gegenüber einem Volumen von etwa 6 ccm der Flüssigkeit. In der Hasselbalchschen Elektrode hat der Gasraum mindestens das gleiche, oder sogar ein größeres Volumen als der Flüssigkeitsraum. Daher ist die Menge der aus der Flüssigkeit entweichenden Kohlensäure bei der Hasselbalchschen Elektrode sehr viel größer als bei unserer Anordnung, und wir haben nicht nötig, die Flüssigkeit nach der Einstellung des Gleich-

gewichtes zu erneuern. Durch einfache Rechnung könnte man feststellen, wie klein der von uns gemachte Fehler in der Bestimmung der H-Konzentration ausfallen müßte. Wir wollen aber hier diese Berechnung nicht durchführen, sondern experimentell erweisen, daß der gemessene Wert der richtige ist.

Dies tun wir auf zwei Weisen, erstens durch gleichzeitige colorimetrische Messung, zweitens durch Parallelmessung mit unserer und der Hasselbalchschen Elektrode.

I. Vergleichsmessungen mit Hilfe einer colorimetrischen Methode.

Das zu messende künstliche Carbonatgemisch, das in bezug auf die [H˙] und auf die Menge der CO_2 dem Blut einigermaßen entsprechen sollte, wurde folgendermaßen hergestellt.

Eine 1,08 %ige Lösung von krystallisiertem Natriumcarbonat wurde tropfenweise mit soviel HCl-Lösung versetzt, bis sie nach Maßgabe einer ungefähren colorimetrischen Schätzung mit Neutralrot etwa die Alkalität des Blutes angenommen hatte. Der definitive Farbenton wurde so gehalten, daß er bald kaum orangestichig gelb, bald deutlicher orange oder auch fast rotorange eingestellt wurde. Nach Fertigstellung der Lösung wurde sie luftdicht verschlossen, bis zur Beendigung des Versuches aufbewahrt und mit Pipetten unter möglichster Vermeidung von CO_2-Verlusten die Flüssigkeitsproben entnommen. Es wurden zu jedem einzelnen Versuch drei Proben entnommen. Mit je zweien wurde eine Doppelbestimmung auf die soeben beschriebene Weise vorgenommen, die dritte Probe von 10 ccm wurde zu einer colorimetrischen Messung in folgender Weise benutzt. Sie wurde in einem Reagensglas mit genau einem Tropfen einer $^1/_4$ %igen Neutralrotlösung versetzt und mit verschiedenen, frisch hergestellten Phosphatgemischen colorimetrisch verglichen. Um den Salzfehler des Neutralrots auszuschalten, wurde die Gesamtmenge an Phosphat niemals über etwa $^n/_{30}$ gebracht. Nun wurde dasjenige Phosphatgemisch, das dem Carbonatgemisch in der Farbe am ähnlichsten schien, einer elektrometrischen Messung unterworfen. Die einzelnen Versuche hatten folgendes Resultat:

Tabelle II.

Versuch Nr.	Elektrometrische Messung des Carbonatgemisches p_H = a	b	Elektrometrische Messung des colorimetrisch entsprechenden Phosphatgemisches p_H =
1[1])	6,78	6,83	6,77
2	7,49	7,32	7,32
3	7,29	7,11	7,26
4	7,36	7,30	7,32
5	7,06	7,09	7,10
6	7,34	7,41	7,49
7	7,24	7,24	7,31
8	7,36	7,27	7,44
9	6,72	6,77	6,84
10	7,34	7,34	7,37
11	7,46	7,45	7,45
12	7,33	7,43	7,43
13	7,51	7,52	7,57
14	7,76	7,83	7,77
15	7,49	7,51	7,49
16	7,89	7,93	7,91
17	7,84	7,86	7,77

Die Übereinstimmung der Parallelversuche a und b wird mit fortschreitender Versuchszahl immer besser, ein eventueller Mangel an Übereinstimmung beruht nicht auf Fehlern der Meßmethode, sondern nur auf der Größe der Geschicklichkeit, mit der es gelingt, jeglichen CO_2-Verlust beim Einfüllen zu vermeiden.

Die Übereinstimmung der dritten Kolonne mit dem Mittel aus den ersten beiden ist so befriedigend, wie sie von einer colorimetrischen Methode verlangt werden kann.

II. Vergleichsmessungen mit der Hasselbalchschen Elektrode.

Als Vorratsgefäß für die Hasselbalchsche Elektrode wurde, um jede Berührung des Carbonatgemisches mit der äußeren Luft zu vermeiden, eine 20 ccm fassende Rekordspritze benutzt und das Erneuern der Flüssigkeit im Elektrodenraum nur durch Senken des luftblasenfrei aufsitzenden Spritzenkolbens bewirkt.

Notiert ist nur diejenige Zahl p_H, die sich nach mehrmaligem Wechseln der Elektrodenflüssigkeit als konstant erwies.

[1]) Dieser Versuch wurde mit Lackmustinktur ausgeführt statt mit Neutralrot.

Versuch Nr.	Hasselbalchsche Elektrode	Unsere Elektrode a	Unsere Elektrode b
1	7,73	7,71	—
2	7,49	7,43	—
3	7,17	7,01	7,07
4	7,18	7,19	7,20
5	7,21	7,16	—
6	7,91	7,83	7,84
7	7,73	7,69	7,70
8	7,60	7,63	7,63
9	7,57	7,59	7,52

In Versuch 3 besteht eine Divergenz der Hasselbalchschen Elektrode von + 0,13. Wir haben in diesem Falle Grund anzunehmen, daß die Konstanz der Hasselbalchschen Elektrode noch nicht ganz erreicht war. Der Gasraum wurde hier relativ besonders groß genommen, so daß nach Verbrauch der Vorratsflüssigkeit in der Spritze die Zahl der Durchspülungen noch nicht ausgereicht haben mag. Nicht ganz so groß ist die Abweichung in Versuch 6. Alle übrigen stimmen gut überein. Jedenfalls besteht nirgends eine Abweichung in dem Sinne, daß unsere Elektrode einen zu alkalischen Wert gegeben hätte, was man nach den Erörterungen von Hasselbalch hätte befürchten können.

Hiermit haben wir also ein sehr einfaches Mittel gewonnen, um auch in kohlensäurehaltigen Flüssigkeiten befriedigend exakte Messungen der Wasserstoffionenkonzentration zu machen. Der erreichbare Grad der Reproduzierbarkeit ist derart, daß Parallelmessungen, die sich um 0,1 im Wasserstoffexponenten unterscheiden, in der späteren Zeit, nach genügender Einübung, niemals mehr vorkamen. Der Unterschied betrug selten noch 0,06, d. h. etwa 3 Millivolt (vgl. dazu Tab. V), meist weniger. Die praktisch nicht in Betracht kommende, aber immerhin konstatierbare geringere Genauigkeit der Messungen kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten im Vergleich zu derjenigen kohlensäurefreier Flüssigkeiten sind zweifellos nicht in der Methode der Messung begründet, sondern darin, daß so minimale Kohlensäuremengen, wie sie zur Veränderung der EMK um 2 bis 3 Millivolt notwendig sind, auch beim sorgsamsten Übertragen der Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß in die Elektrodengefäße möglich sind, bevor man eine gewisse Routine erlangt hat. Die Reproduzierbarkeit der Werte

erfüllt die Ansprüche, welche z. B. Sörensen[1]) für physiologische Flüssigkeiten aufstellt, durchaus.

Die erste Anwendung, die wir nun von dieser Methode machen wollen, ist der Vergleich der Wasserstoffionenkonzentration eines Carbonatgemisches bei verschiedenen Temperaturen, insbesondere bei Zimmertemperatur von ungefähr 18° und bei 37,5°. Der Theorie nach ist ja

$$[H^{\cdot}] = k \cdot \frac{[CO_2]}{\alpha \cdot [NaHCO_3]}.$$

k für $18° = 3{,}04 \cdot 10^{-7}$, für 38° ein wenig größer. α ist bei einem Gehalt von rund $^n/_{10}$-Na˙ etwa auf 0,8 zu schätzen, genau aber nicht bekannt.

Da der Dissoziationsgrad (α) der Elektrolyte recht wenig mit der Temperatur schwankt, und da auch die Dissoziationskonstante der Kohlensäure innerhalb dieses Temperaturgebietes sich um nicht viel ändert, so sollte die Wasserstoffionenkonzentration eines Carbonatgemisches zwischen 18 und 37,5° sich so wenig ändern, daß die Änderung vielleicht eben die Fehlergrenzen der Messung überschreitet. Der Versuch bestätigt diese Theorie vollkommen (Tabelle S. 139). Der Unterschied ist sogar noch geringer, als erwartet werden konnte. Man muß aber bedenken, daß die Daten von k und α für 37,5° nicht so genau bekannt sind, daß man schon von einer Abweichung von der Theorie sprechen dürfte.

Die Wasserstoffionenkonzentration eines Carbonatgemisches bei Zimmertemperatur und bei 37,5°.

Die Versuche bei 37,5° wurden folgendermaßen durchgeführt. Die gefüllten Elektroden wurden mit einem knapp schließenden Gummistopfen (um eine Kompression der Wasserstoffblase zu vermeiden) zunächst in einem Wasserbad wenige Minuten angewärmt, dann der Stopfen kurz gelüftet (zum Druckausgleich)[2]) und luftblasenfrei wieder sofort geschlossen,

[1]) Ergebnisse der Physiol. 1912.

[2]) Um diese unbequeme Prozedur zu erleichtern, sowie auch, um sonst das Verschließen mit der Fingerkuppe zu vermeiden, habe ich jetzt Elektroden konstruieren lassen, deren offenes Ende mittels eines eingeschliffenen, mit einer Bohrung versehenen Glasstöpsels geschlossen werden kann. Bei einer bestimmten Stellung des Stöpsels kommuniziert

dann abwechselnd 10 mal im Zimmer geschaukelt und wieder im Wasserbad gewärmt, bis 150 Umdrehungen erreicht waren, dann im Luftthermostaten gemessen. Der erste abgelesene Wert war bis auf minimale nachträgliche Änderungen zugleich der definitive, konstante Wert.

Versuch Nr.	p_H bei Zimmertemperatur (18 bis 22°) a	b	p_H bei 37,5° a	b
1	7,45	—	7,48	—
2	7,61	7,60	7,63	—
3	7,62	7,63	7,55	—
4	7,57	—	7,53	7,53
5	7,54	7,52	7,53	7,56
6	7,63	7,63	7,59	—
7	7,80	7,84	7,77	7,75

III. Anwendung der Methode auf Blut und Körperflüssigkeiten.

Will man diese Methode auf das Blut anwenden, so kommt als einzige, allerdings unerläßliche Ergänzung hinzu die Vermeidung der Gerinnung. Dies geschieht, wie auch die früheren Autoren, so auch wir selbst und Hasselbalch empfohlen haben, durch Zusatz von Hirudin. Dieses kann an sich keinen meßbaren Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration ausüben. Andererseits bringt jede Ablagerung von Fibrin auf die Platinelektrode in den meisten, wenn auch nicht in allen Fällen ein sehr merkliches Sinken der EMK mit sich, das nicht sicher zu einem konstanten, und dann jedenfalls viel zu sauren Wert führt. Es ist wohl möglich, daß die Ursache eine Schädigung der Elektrode ist, möglich auch, daß die vom Fibrin eingeschlossene Flüssigkeit wirklich saurer ist, jedenfalls sind Messungen, bei denen sich Fibrin auf dem Platin niederschlägt, unbedingt zu verwerfen. Andernfalls aber stellt sich der Wert bei Messungen des Blutes genau so schnell und konstant ein,

---

die Bohrung mit der Außenluft. Während des Schaukelns dreht man öfters vorübergehend den Stöpsel in diese Stellung, um einen Druckausgleich herbeizuführen. Dadurch wird erreicht, daß der Gasraum, gegen welchen sich die Flüssigkeit in Gleichgewicht setzt, beim Schütteln unter gleichem Druck steht wie später beim Messen. Diese Elektroden werden von den „Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf" unter dem Namen „Gaselektroden mit Druckausgleich" hergestellt. M.

wie sonst bei Carbonatgemischen[1]). Beobachtet man nun die EMK für längere Zeit, so bemerkt man in sehr vielen Fällen, abweichend von dem Verhalten einfacher Carbonatgemische, nach 24 Stunden doch ein kleines Absinken der EMK, besonders auffällig manchmal bei Messungen bei 38°. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß es sich hier nicht um eine verlangsamte Einstellung des Gleichgewichtes handelt, sondern um eine nachträgliche Änderung der Blutflüssigkeit in bezug auf ihre Alkalität: das Blut wird allmählich infolge der postmortalen Bildung einer Säure weniger alkalisch. Denn die innerhalb der ersten zwei Stunden erhaltenen Werte sind so konstant, daß eine verlangsamte Einstellung auszuschließen ist. Man kann nun diese, wenn auch praktisch kaum ins Gewicht fallende Störung noch vermindern, wenn man mit verdünntem Blut arbeitet. Die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes wird nämlich nicht verändert, wenn man es mit 0,85%iger Kochsalzlösung verdünnt. Der Hauptregulator in der Blutflüssigkeit ist das Carbonatgemisch desselben. Bestimmend ist nur das Verhältnis von freier CO_2 zu Bicarbonat. Einen ganz geringen Einfluß hat natürlich auch der elektrolytische Dissoziationsgrad des Natriumbicarbonats, der seinerseits von der Gesamtkonzentration an Na abhängt. Da nun durch das Verdünnen mit 0,85%iger ClNa-Lösung die Na-Konzentration des Blutes sich nicht merklich ändert, so bleibt die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes bei der Verdünnung ganz ungeändert. Der Versuch bestätigt diese Behauptung aufs vollkommenste (Tabelle III).

Wir führen demnach die Messung des Blutes auf folgende Weise aus:

Unsere Elektrode wird mit ausgekochter, unter Verschluß abgekühlter und daher kohlensäurefreier Kochsalzlösung gefüllt, dann Wasserstoff unter die Elektrode eingefüllt, bis die Spitze

[1]) Auch die Absetzung der Blutkörperchen unter das Niveau der Platinelektrode ändert die EMK nicht, im Gegensatz zu der Angabe von Lundsgaard, der damit eine saurere Reaktion der Blutkörperchen zu beweisen glaubt. Die Blutkörperchen schwimmen jedoch wie ein indifferenter Fremdkörper in der Flüssigkeit, und die Platinelektrode taucht gar nicht in das Innere der Blutkörperchen hinein, auch wenn sie noch nicht abgesetzt sind.

Tabelle III.

Vergleich von verdünntem und unverdünntem Blut.

	Unverdünnt	Mit 0,85 %iger ClNa-Lösung ca. 5fach verdünnt	
		a	b
1. Venöses Kaninchenblut . .	7,57	5,59	7,60
2. „ „ . .	7,52	7,50	7,55
3. Arterielles „ . .	7,52	7,54	7,54
4. Geschlagenes Hammelblutblut (Reaktion durch Entweichen von CO_2 alkalischer als im Körper)	7,73	7,78	—
5. Ebensolches	7,91	7,91	—
6. Venöses Menschenblut (Hysterie)	7,42	7,45	7,45
7. Kaninchenserum bei 19° .	7,75	7,75	—
8. Dasselbe bei 37,5°	7,54	7,58	—

des Platindrahtes noch gerade eintaucht, sodann einige Körnchen Hirudin in den offenen Schenkel, direkt auf die Glaswand, geschüttet. Man reguliere den Flüssigkeitsgehalt des Gefäßes derart, daß noch 1 bis 1,5 ccm des offenen Schenkels leer sind. Nunmehr entnehme man dem Menschen mit einer Spritze das Blut aus der Ellbogenvene luftblasenfrei und fülle sofort die Elektrode vollkommen mit dem Blut auf (d. h. mit 1 bis 1,5 ccm Blut), verschließe sie sofort luftblasenfrei mit der Daumenkuppe oder besser mit dem vorher beschriebenen Glasstopfen und nun kippe man die Elektrode hin und her, so daß die Wasserstoffblase das ganze Gefäß mindestens 100 mal durchstreicht. Dann ist die Elektrode für die Messung vorbereitet. Der ganze Versuch wurde fast stets doppelt angesetzt, die Übereinstimmungen der Doppelmessungen waren stets gut. Der sofort abgelesene Wert entspricht, wenn die Schüttelung genügend war, fast sofort dem definitiven, und ändert sich selbst in 24 Stunden meist kaum, selten mehr als um 2 Millivolt. Die von verschiedenen Fällen erhobenen Werte sind in Tabelle IV (von Gesunden) und V (von Kranken) zusammengestellt. Diese Messungen sind sämtlich bei einer Temperatur von 18° bis höchstens 23° gemacht.

Die Versuche wurden nun derartig erweitert, daß stets auch eine Messung des durch destilliertes Wasser lackfarben gemachten Blutes ausgeführt wurde. Die Versuche wurden genau wie die anderen ausgeführt, nur daß als Verdünnungs-

flüssigkeit CO_2-freies destilliertes Wasser benutzt wurde. Es zeigte sich nun, daß die Reaktion des lackfarbenen Blutes saurer ist, als die des genuinen Blutes, und zwar ist p_H^- im lackfarbenen Blut gewöhnlich um 0,1 bis 0,2 kleiner (s. Tabelle IV, V, VI. Das ist nicht anders zu erklären als durch eine saurere Reaktion der Blutkörperchen, welche nach deren Auflösung der ganzen Flüssigkeit mitgeteilt wird. Wir können somit die Angabe von Hasselbalch von der saureren Reaktion der Blutkörperchen bestätigen[1]).

Tabelle IV.

Fall Nr.	Blut von normalen Menschen bei 18°			
	verdünnt mit 0,85°/₀iger NaCl-Lösung		verdünnt mit destilliertem Wasser	
1	7,57	7,61	7,56	7,57
2	7,62	7,67	7,53	7,53
3 (Hyst.)	7,54	7,56	—	—
4 Lues lat.	7,52	7,56	7,46	7,44
5	7,49	7,57	7,40	7,42
6	7,49	7,49	7,39	7,41
7 (Tbc.?)	7,53	—	7,43	—
8 (Tbc.?)	7,53	7,57	7,45	—
9 (Tbc.?)	7,59	7,56	7,47	—
10	7,58	7,55	7,46	—
11 Bronchit.	7,56	7,55	7,47	—
12 Senex	7,63	7,65	7,45	—
Mittelwert:	7,56		7,47	
	Größte Abweichungen vom Mittel: +0,08 −0,07		Größte Abweichungen vom Mittel: +0,095 −0,07	

Nun war unsere Aufgabe, vergleichende Messungen bei Körpertemperatur auszuführen. Die Messungen des Blutes bei 37,5° geschahen im Luftthermostaten. Die Vorwärmung und das Schütteln geschah genau wie es für Carbonatgemische oben beschrieben wurde. Die Messungen gaben durchaus be-

[1]) Trotz der Anmerkung S. 140. Hasselbalch zitiert unter den Autoren, welche vor ihm eine alkalischere Reaktion des Blutserums gegenüber den Blutkörperchen festgestellt hätten, auch Michaelis und Rona. Diese Autoren können diese Priorität nicht annehmen, denn sie haben in der zitierten Arbeit stets nur mit Serum gearbeitet, welches in offenen Gefäßen abgesetzt war und daher CO_2 verloren hatte.

Tabelle V.

Fall	Menschenblut aus der Ellbogenvene mit 0,85 %iger ClNa-Lösung verdünnt. Doppelmessung von p_H a	b	mit destilliertem Wasser verdünnt. Doppelmessung von p_H a	b
Coma diabetic.	7,11	7,18	7,07	7,07
Chron. Bleivergiftung	7,42	7,45	7,33	7,31
Anämie	7,50	7,53	7,48	7,47
Aorteninsuffic., Ödem	7,56	7,56	7,36	7,36
Chron. Nephritis	7,57	7,59	7,40	7,41
Icterus catarrhalis	7,57	7,57	7,42	7,47
Anämie nach Blutung	7,57	7,62	7,45	—
Polyarthritis	7,57	7,64	7,44	—
Nephrit. chron.	7,59	7,61	7,43	7,40
Arterioskler., Nephritis	7,59	7,62	7,44	7,45
Phthisis, Temp. 40°	7,59	7,60	7,47	7,49
Purpura	7,59	7,61	7,49	7,49
Carcinom, 38°	7,59	7,62	7,50	—
Carcinom	7,60	7,64	7,46	7,46
Typhus	7,60	7,61	7,50	7,51
Erysipel	7,61	7,61	7,50	7,53
Coma uraemic.	7,61	7,62	7,50	7,54
Bleivergiftung	7,62	7,56	7,49	—
Nephrit. chron.	7,64	7,67	7,50	7,51
Basedow	7,65	7,60	7,51	7,51
Arterioskl., Nephrit.	7,66	7,66	7,47	7,45
Diabetes ohne Aceton	7,66	7,66	7,49	7,49
Gicht (?)	7,66	7,67	7,49	7,49
Anämie, Purpura	7,66	7,69	7,49	7,49
{Pneumonie, 40°	7,71	7,74	7,49	7,56
{Pneumonie nach Krise	7,69	7,69	7,49	7,48
Sepsis, Phlegmone, 38,5°	7,71	7,71	7,54	7,56
Hemiplegia luet., im Sopor	7,73	7,74	7,55	7,57

friedigend konstante Werte, nur wurde verhältnismäßig häufiger beobachtet, daß nach länger als $1^1/_2$ bis 2stündiger Konstanz der EMK ein merklicher Abfall derselben eintrat, der nach 24 Stunden manchmal erhebliche Werte erreichte. Wir tragen kein Bedenken, diese späteren Veränderungen nach anfänglich guter Konstanz für sekundäre Veränderungen zu erklären. Sämtliche Messungen ergaben nun für das gleiche Blut einen etwas kleineren Wasserstoffexponenten bei 37,5° als bei 18°. Der Unterschied betrug durchschnittlich 0,21 und schwankte bei den einzelnen Versuchen um diesen Wert nicht mehr als den Fehlergrenzen der Methode entspricht. Genau dasselbe Verhalten zeigten auch Blutsera und Exsudate, und zwar

Tabelle VI.

Einige Messungen an Kaninchenblut bei ca. 20°. Auf Zustand der Tiere, Atmung, Fesselung usw. wurde keine Rücksicht genommen. Die Schwankungen sind viel größer als beim Menschen.

	Unverdünnt	Mit ClNa verdünnt	Mit H_2O verdünnt
Kaninchenblut (venös)	—	—	7,50
"	—	7,46	7,32
"	—	—	7,48
"	—	7,70	7,48
"	7,57	7,59; 7,60	7,32; 7,37
"	7,52	7,50; 7,55	7,38; 7,37
"	—	7,55; 7,52	—
"	7,53	7,55	—
Kaninchenblut aus der Art. carotis	7,47	—	—
"	7,52	7,54; 7,54	—
"	—	7,64; 7,66	—
"	—	7,13; 7,14	—
"	—	7,25; 7,27	—

nicht nur solche, welche unter Vermeidung von CO_2-Verlust gewonnen waren, sondern auch an freier Luft spontan ausgepreßte Sera, welche, absolut genommen, natürlich einen zu alkalischen Wert ergaben.

Tabelle VII.

Messungen von venösem Menschenblut bei verschiedenen Temperaturen.

Fall Nr.	t	Verdünnt mit ClNa: im Zimmer bei t° a	Verdünnt mit ClNa: im Zimmer bei t° b	Verdünnt mit ClNa: im Thermostaten bei 37,5° a	Verdünnt mit ClNa: im Thermostaten bei 37,5° b	Verdünnt mit H_2O: im Zimmer (Temperatur wie in Kolonne t)	Verdünnt mit H_2O: bei 37,5°	Differenz der Mittelwerte von p_H im Zimmer und bei 37,5° (bei ClNa-Verdünnung)
1	22	7,61	7,60	7,41	7,39	7,50	—	0,205
2	22	7,59	7,62	7,42	7,42	7,49	7,28 7,30	0,185
3	25	7,46	—	7,24	—	7,37	7,10	0,20
4	23	7,52	7,49	7,36	7,34	7,40	7,20 7,24	0,155
5	22,5	7,58	7,56	7,46	7,38	7,48	7,17	0,15
6	19	7,62	7,56	7,33	7,33	7,50	7,15 7,12	0,26
7	18	7,58	7,55	7,35	7,27	7,46	7,16 7,19	0,255
8	20	7,52	7,51	7,38	7,26	7,43	7,20	0,22
9	20	7,59	7,61	7,34	7,36	7,41	7,29 7,22	0,25
							Mittel:	0,209

Tabelle VIII.

Vergleichende Messungen von Blutserum bei Zimmertemperatur von t^0 und bei 37,5°.

(Die Blutsera sind zum Teil durch gewöhnliches Absetzen aus dem Blutkuchen ohne Vermeidung von CO_2-Verlusten gewonnen und geben nicht den physiologischen Wert für p_H wieder, sondern sollen nur den Temperatureinfluß demonstrieren.)

Fall Nr.	t^0	Im Zimmer		Bei 37,5°		Differenz zwischen den Mittelwerten im Zimmer und bei 37,5°
1	23	7,64	7,62	7,44	7,40	0,21
2	24	7,75	7,79	7,58	7,54	0,21
3	25	7,61	7,52	7,38	7,35	0,20
4	23	7,55	7,52	7,38	7,39	0,15
5	20	7,68	7,70	7,48	7,47	0,215
6	23	7,42	7,41	7,29	7,32	0,115
7	19	7,71	7,62	7,38	7,41	0,27
8	18	7,64	7,65	7,38	7,39	0,26
					Mittel:	0,21

Aber der Unterschied der p_H für die beiden verschiedenen Temperaturen war der gleiche, nämlich 0,21. Wir glauben daher, vorbehaltlich weiterer Bestätigung durch längere Erfahrung, daß man stets aus dem bei Zimmertemperatur gewonnenen Wert von p_H den Wert für 38° einfach durch Subtraktion von 0,21 berechnen kann.

Da reine Carbonatgemische diesen Temperatureinfluß nicht zeigen, da ferner reine Phosphatgemische diese Erscheinung nicht zeigen und auch im Blute gegenüber den Carbonaten nur in verschwindender Menge vorhanden sind, so kann die Schuld nach unseren bisherigen Kenntnissen nur dem Eiweiß zugeschrieben werden. Denn auch das Eiweiß im Blut verhält sich wie das Anion einer schwachen Säure, weil die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes weit unterhalb des isoelektrischen Punktes der Eiweißkörper des Blutes liegt. Daher ist auch das Verhältnis von undissoziiertem Eiweiß zu den Eiweißanionen ein Regulator der H-Ionenkonzentration. Dieses Verhältnis wird sich nun wohl nicht mit der Temperatur ändern, wohl aber ist es möglich, daß die Dissoziationskonstante des Eiweißes mit der Temperatur sich viel stärker ändert als die der Kohlensäure. Die bisher vorliegenden Daten über die

Dissoziationskonstanten der Aminosäuren lassen es wahrscheinlich erscheinen, daß ihre Konstanten von der Temperatur viel stärker abhängen als die der einfachen Säuren. Sie dürften wohl in der Mitte stehen zwischen der Essigsäure, deren Konstante sich zwischen 18° und 38° so gut wie nicht ändert, und dem Wasser, dessen Konstante sich in diesem Temperaturintervall vervierfacht. Jedenfalls scheinen die $[H^{\cdot}]$ des Bluts und Serums bei 38° und bei 18° in der konstanten Beziehung zueinander zu stehen, daß p_H bei 38° um 0,21 kleiner ist als bei 18 bis 22°.

Der für 18° gefundene Wert des gesunden venösen Blutes $p_H = 7{,}56$ würde also für 38° ergeben $p_H = 7{,}35$.

Wenn wir unsere heutigen Resultate mit den früheren, mit offenbar für diesen Zweck noch unvollkommenen Methoden gewonnenen Zahlen vergleichen, so bemerken wir, daß die Korrektur, die wir an unseren früheren Zahlen vornehmen müssen, nicht bedeutend ist. Auch mit den Zahlen, die Hasselbalch[1]) an defibriniertem Ochsenblut erhielt ($p_H = 7{,}37$) ist die Übereinstimmung vollkommen. Wir haben nun noch die Aufgabe, auf die von Hasselbalch empfohlene Vorbereitung des Blutes zur Messung einzugehen. Hasselbalchs Vorbereitung des Blutes besteht darin, daß er das Blut zunächst durch Schütteln defibriniert und dann mit einem Luft-Kohlensäuregemisch von geeigneter Zusammensetzung in Gleichgewicht bringt. Man muß Hasselbalch zugeben, daß es für eine gewisse Fragestellung rationeller wäre, das Blut bei einer experimentell genau festgelegten CO_2-Spannung zu messen, weil diese ja im Körper je nach dem Respirationsmodus und je nach Maßgabe der jeweiligen Kohlensäureproduktion schwanken muß. Aber diese Schwankungen sind beim ruhenden, normalen Menschen nur sehr gering.

Jedenfalls aber gehen die Hasselbalchsche Methode und unsere von verschiedenen Fragestellungen aus. Unsere Methode beantwortet die Frage: Welche Wasserstoffionenkonzentration herrscht in dem zirkulierenden (venösen) Blute des untersuchten Falles? Hasselbalch dagegen fragt: Welche Wasserstoffionenkonzentration würde herrschen, wenn das Blut des untersuchten Falles unter einer ganz bestimmten CO_2-Spannung stände?

---

[1]) Hasselbalch, diese Zeitschr. **30**, 317, 1911; vgl. daselbst S. 331; ferner Hasselbalch und Lundsgaard, ebenda **38**, 77, 1912.

Die saureren Werte von Lundsgaard (l. c.) für hirudiniertes Menschenblut (7,19 für 38°) können wir vorläufig nicht erklären.

Eine von uns vorläufig nur einmal ausgeführte gleichzeitige Messung des venösen und des arteriellen Blutes desselben Kaninchens ergab für 18°:

	Art. carotis		Vena jugularis	
	a	b	a	b
	7,64	7,66	7,55	7,52
oder korrigiert für 37,5°:	7,43	7,45	7,34	7,31

Die Differenz der Mittelwerte für Arterie und Vene beträgt 0,115, d. h. die Wasserstoffionenkonzentration des venösen Blutes ist um 34% höher als die des arteriellen.

Betrachten wir zum Schluß die für das venöse Menschenblut erhaltenen Resultate, so ergibt sich für den normalen Menschen für 18°:

$$p_H = 7{,}56 \quad \text{oder} \quad [H^{\cdot}] = 0{,}28 \cdot 10^{-7},$$

demnach für 37,5°:

$$p_H = 7{,}35 \quad \text{oder} \quad [H^{\cdot}] = 0{,}45 \cdot 10^{-7}.$$

Daraus berechnet sich für das, was wir die „relative Alkalität“ bezeichnen[1]), nämlich das Verhältnis von $[OH']$ zu $[H^{\cdot}]$ für 18° [unter Zugrundelegung von $k_w = 10^{-14,14}$ nach L. P. S. Sörensen:

$$[OH'] = 2{,}6 \cdot 10^{-7}$$
$$\frac{[OH']}{[H^{\cdot}]} = 9{,}3,$$

oder unter Zugrundelegung von $k_w = 0{,}58 \cdot 10^{-14} = 10^{-14,24}$:

$$[OH'] = 2{,}1 \cdot 10^{-7}$$
$$\frac{[OH']}{[H^{\cdot}]} = 7{,}5\text{[2]});$$

für 37,5° unter Zugrundelegung von $k_w = 2{,}6 \cdot 10^{-14} = 10^{-13,59}$:

$$[OH'] = 5{,}8 \cdot 10^{-7}$$
$$\frac{[OH']}{[H^{\cdot}]} = 12{,}9\text{[3]}).$$

Wenn man sich auf den Wert von k_w für 37,5° verlassen kann, ist also der Temperaturkoeffizient von $\frac{[OH']}{[H^{\cdot}]}$ kleiner, als früher angenommen wurde.

[1]) L. Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 18, 317, 1909.

[2]) In der früheren Arbeit von L. Michaelis und P. Rona angegeben zu rund 7.

[3]) Früher angegeben zu rund 20.

Die bisherigen, alle in den Sommermonaten ausgeführten Messungen beim gesunden, ruhenden Menschen ergaben als höchste Abweichungen vom Mittel für p_H + 0,08 und — 0,07, also Werte, die die Fehlergrenzen der Methode nur gerade überschreiten dürften.

Die Abweichungen bei Kranken betrugen, wenn man vom Coma diabeticum mit einer Abweichung von — 0,44 absieht, im höchsten Fall — 0,14 (chronische Bleivergiftung) und + 0,17 (Hemiplegia mit Sopor).

Wir müssen Hasselbalch zugeben, daß wir bei dieser Methode, ohne eine gleichzeitige Bestimmung der CO_2-Spannung und der Gesamt-CO_2 im Blute, im Einzelfall nicht feststellen können, ob pathologische Abweichungen auf dem abweichenden Gehalt an CO_2 oder dem einer anderen Säure oder Base beruhen. Dafür messen wir aber diejenige [H˙], die wirklich im Venenblut des Menschen herrschte. Sollte man z. B. in Zukunft in der Lage sein, die Wirksamkeit irgendeines Fermentes im Blut genau auf die [H˙] des Blutes zu beziehen, so würden unsere Zahlen den hierfür in Betracht kommenden Wert für [H˙], wenigstens in der Vene, direkt anzeigen. Auch z. B. den Löslichkeitsbestimmungen im Blut, etwa der Harnsäure oder des Kalkes, werden wir diesen Wert zugrunde legen müssen.

Anhang.

Die gesättigte Kalomelelektrode.

Seit einem halben Jahre verwendeten wir zunächst neben, später anstatt der von Bjerrum und L. P. S. Sörensen empfohlenen Kalomelelektrode mit $^n/_{10}$-KCl-Lösung eine solche mit gesättigter KCl-Lösung. Die KCl-Lösung wird in siedend gesättigtem Zustand eingefüllt und das auskrystallisierende KCl nebst einem noch hinzugefügten tüchtigen Überschuß an KCl-Krystallen als Bodenkörper beibehalten. Die Elektrode hat den Vorteil, daß sie unbegrenzt haltbar ist, ohne daß jemals ihre Flüssigkeit erneuert zu werden braucht. Sie kann dauernd in Kontakt mit der bei der Messung benutzten Wanne von gesättigter KCl-Lösung aufbewahrt werden, ihre Zuleitung zu derselben kann wegen der guten Leitfähigkeit auch während der Messung durch einen geschlossenen Glashahn unterbrochen bleiben. Manchmal ist ihre Potentialdifferenz am ersten Tage

um 2 bis 3 Millivolt niedriger, als ihrem definitiven Wert entspricht, der sich spätestens nach 8 bis 14 Tagen einstellt und niemals mehr ändert. Schüttelt man sie, so fällt sie oft um 2 bis 3 Millivolt, stellt sich aber schnell wieder her. Der definitive Wert schwankte bei verschiedenen Elektroden um einige Zehntel Millivolt. Er wurde in größeren Abständen dadurch kontrolliert, daß die Potentialdifferenz gegen die „Standardacetatelektrode"[1] in 3 bis 4 gleichzeitigen Parallelmessungen festgestellt wurde. Diese betrug im Mittel bei einer Zimmertemperatur zwischen 18 und 22° in gleicher, für dieses Temperaturbereich konstanter Weise 0,5175 Volt, für 37 bis 38° 0,520 Volt. Diese Potentialdifferenz werde als α bezeichnet. Der Wert von p_H wird aus der gemessenen EMK nach der Formel berechnet:

$$p_H = \frac{\text{EMK} - \beta}{f(t)}.$$

Hierin ist $f(t)$ für:
17° = 0,0575
18° = 0,0577
19° = 0,0579
20° = 0,0581
21° = 0,0583
22° = 0,0585
23° = 0,0587
37° = 0,0615
38° = 0,0617

und β ist $= \alpha - \gamma \cdot f(t)$, wo γ den Wasserstoffexponenten des Standardacetatgemisches bedeutet. Es ist γ

für 15 bis 24° = 4,62
„ 37 „ 38° = 4,64.

Daraus ergibt sich β für:
17° = 0,252
18° = 0,251
19° = 0,250
20° = 0,249
21° = 0,248
22° = $0,247_8$
23° = $0,246_4$
37° = 0,235
38° = 0,234

[1]) Standardacetatlösung ist folgendes Gemisch: 50 cm n-NaOH, 100 ccm n-Essigsäure, 350 ccm Wasser.

Für den praktischen Gebrauch dürfte die Genauigkeit dieser Zahlen vorläufig genügen. Ihre genaue Festlegung später weiter durchgeführt werden.

Der sehr geringe Temperaturkoeffizient dieser Elektrode gegen die Standardacetatlösung bringt es, wie der Leser selbst nachrechnen möge, mit sich, daß bei Messungen, die zwischen 300 und 700 Millivolt liegen, eine genaue Temperaturmessung der Flüssigkeit für Messungen bei Zimmertemperatur kaum nötig ist. Man kann fast stets unter der Fiktion rechnen, daß man bei 20° arbeite, und danach eine Tabelle ausrechnen, die für jede gemessene Potentialdifferenz den Wert von p_H anzeigt. Wenn man z. B. bei 22° 0,7000 Volt gemessen hat, so gibt das nach genauer Berechnung $p_H = 7{,}74_0$, und unter der Fiktion, die Messung sei bei 20° gemacht worden, $p_H = 7{,}76_1$. Dies ist aber schon der ungünstigste Fall. Eine (der oben ungefähr entsprechende) EMK von 0,7870 Volt gegen die $^n/_{10}$-Kalomelelektrode würde für 22° bedeuten[1]): $p_H = 7{,}68_7$, dagegen für 20°: $p_H = 7{,}73_6$. Die gesättigte Kalomelelektrode beansprucht daher nicht eine so genaue Berücksichtigung der Temperatur wie die $^n/_{10}$-Kalomelelektrode, vorausgesetzt, daß die Elektrode selbst nicht plötzlichen Temperaturschwankungen ausgesetzt wird, denen sie infolge ihrer Beschaffenheit nur allmählich folgt.

Zusammenfassung.

Das Hasselbalchsche Prinzip des Schaukelns der Elektrode vor der Messung wird auf unsere einfachere Form der Elektrode übertragen und so eine zuverlässige und einfache Methode gewonnen, um mit 1 bis 1,5 ccm Blut eine elektrometrische Bestimmung der Alkalität zu ermöglichen, die auch klinisch anwendbar ist. Als Mittelwert des normalen Venenblutes des Menschen wird gefunden: $p_H = 7{,}35$ für 37,5°. Der entsprechende Wert für 18° ist für jedes Blut oder Serum um 0,21 größer, während eiweißfreie Carbonatgemische zwischen 18 und 38° ihre [H˙] nicht meßbar ändern. Die mittlere [H˙] des venösen Menschenblutes bei 38° ist daher $= 0{,}45 \cdot 10^{-7}$.

---

[1]) Unter Zugrundelegung der von Sörensen und Koefoed erhaltenen, durch Hasselbalch und Lundsgaard mitgeteilten Messungen, diese Zeitschr. 38, 77, 1912, daselbst S. 81.

Weitere Studien über das Pollentoxin.

Von

O. Kammann.

(Aus dem staatlichen Hygienischen Institut zu Hamburg.)

(Eingegangen am 12. September 1912.)

Mit 2 Figuren im Text.

Trotz unleugbarer Fortschritte in der Erkenntnis der Antigene, dieser so ungemein reaktionsfähigen Substanzen, sind wir auch heute noch nicht imstande, irgendetwas Sicheres über die Natur dieser Körper auszusagen, geschweige denn, einen tieferen Einblick in ihren chemischen Aufbau zu gewinnen.

Soweit sich die vorliegenden Tatsachen überblicken lassen, scheinen diejenigen Stoffe, die, um den Namen Antigen zu verdienen, Antikörperwirkungen hervorzurufen befähigt sein müssen, in ihrem chemischen Aufbau recht verschiedener Art zu sein. Dies geht zweifelsohne schon daraus hervor, daß die verschiedenen Antigene gegen physikalische und chemische Einflüsse ganz verschiedene Widerstandskraft zeigen können. So verhalten sich beispielsweise Ricin, Abrin und auch das Pollentoxin proteolytischen Fermenten gegenüber äußerst resistent, während Diphtherietoxin und Tetanustoxin in vieltausendfachen Dosen vom Trypsin vernichtet werden. Präcipitinogene ertragen tiefeingreifende chemische Prozesse, ohne ihre Antigennatur einzubüßen, und das Pollentoxin, die neurotoxische Komponente des Kobragiftes und andere sind gegen höhere Temperaturen äußerst widerstandsfähig.

Auch das genau studierte und wohlbegründete biologische Verhalten der Antigene spricht für ihre Verschiedenheit, und die relativ geringen Fortschritte, die in der Erkenntnis der chemischen Natur dieser Körper gemacht worden sind, müssen

zum Teil auf mangelhafte Berücksichtigung der experimentell mit diesen Stoffen gewonnenen Erfahrungen zurückgeführt werden.

Das einzige, wohl ziemlich allgemein angenommene, physikalisch-chemische Charakteristikum der Antigene ist ihre kolloide Natur. Ob nun diese Kolloide, die im vorliegenden Falle ausnahmslos den Eiweißkörpern zugerechnet werden müssen, selbst das Antigen oder das Toxin darstellen, oder nur als verunreinigender Ballast betrachtet werden müssen, wissen wir nicht, obwohl des öfteren behauptet worden ist, daß Antigene dargestellt worden seien, die keine gewöhnlichen Eiweißreaktionen mehr geben. Hieraus nun den Schluß zu ziehen, die Antigene wären keine Eiweißkörper, erscheint nicht berechtigt, da es bekannt ist, daß innerhalb des kolloiden Eiweißmoleküls mit seinen sämtlichen charakteristischen Reaktionen bestimmte Kerne enthalten sind, die einem weiteren Eingriff trotzen, stabil sind, und die sehr wohl die toxische resp. antigene Komponente repräsentieren könnten, ohne noch die chemischen Charakteristika des intakten Kolloidkomplexes zu bilden. So hat Kühne und nach ihm besonders Siegfried[1]) experimentell dargelegt, daß fast aus allen Eiweißsubstanzen durch einen bestimmten chemischen Eingriff ein fester Kern aus dem Eiweißmolekül herausgeschält werden kann, der jedem weiteren Eingriff spottet, der nicht alle Eiweißreaktionen mehr gibt und im Tierexperiment äußerst giftig wirkt; dies sind die von Siegfried entdeckten Kyrine.

Auf die Beziehungen dieser Kyrine zum Überempfindlichkeitsphänomen habe ich bereits in meiner Arbeit über Anaphylatoxin[2]) hingewiesen; meine theoretischen Überlegungen über diesen Gegenstand sind später von Schittenhelm und Weichardt[3]) im Experiment bestätigt worden.

Daß die Beimengung von kolloiden Stoffen zu den eigentlichen Antigenen nicht ganz zufällig oder gleichgültig ist, geht schon daraus hervor, daß chemisch-biologisch einwandfrei noch kein Gift dargestellt worden ist, das ebensogut als Antigen

---

1) Siegfried, Verhdl. d. Ges. der Wissenschaften, Leipzig 1903, S. 63.

2) Kammann, Zeitschr. f. Immun.-Forsch. u. experim. Ther. 11, Heft 5.

3) Schittenhelm und Weichardt, Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 2, S. 67.

wirkte als das ungereinigte Ausgangsmaterial. Die anhaftenden eiweißähnlichen Stoffe scheinen auf diese gereinigten Gifte als ein Schutzkolloid zu wirken, da es bekannt ist, daß das z. B. von verschiedenen Autoren rein dargestellte Ricingift, wie auch das von Faust chemisch rein dargestellte Ophiotoxin aus Kobragift weit zersetzlicher und veränderlicher sind, als die von Ballastkolloiden umgebenen ungereinigten Giftstoffe. Faust glaubt sogar auf Grund seiner Ophiotoxinstudien zu der Annahme berechtigt zu sein, daß das Ophiotoxin im nativen Kobragift nicht frei als solches präformiert ist, sondern als Salz oder esterartige Bindung an Eiweiß gekettet ist.

Auch lipoidartige Substanzen, wie beispielsweise Lecithin, vermögen durch physikalische oder chemische Einwirkung die Natur von Toxinen erheblich zu beeinflussen. So hat Kyes[1]) gezeigt, daß die hämotoxische Komponente aus Kobragift mit Lecithin eine Bindung eingeht zu einem neuen Körper, dessen Eigenschaften, namentlich in den Löslichkeitsverhältnissen und in seiner veränderten spezifischen Reaktionsfähigkeit wesentliche Umwandlungen erfahren hat.

Aber auch diese veränderten Löslichkeitsverhältnisse, die scheinbar gegen die Eiweißnatur der Antigene sprechen, vermögen nichts gegen den Eiweißcharakter zu beweisen, da Michaelis und Rona[2]) zeigten, daß auch gewöhnliche Albumosen mit Lecithin derartige lecithidartige Verbindungen eingehen, die in Alkohol und Chloroform löslich sind; eine derartig veränderte Löslichkeit kann daher nicht gegen die Eiweißnatur sprechen.

Hiernach werden wir vorläufig wohl noch an dem alten Begriff des Toxalbumins festhalten müssen, wobei die Frage offenbleibt, ob die Giftwirkung eiweißfreien Körpern zuzuschreiben ist, oder aber durch Verkettung mit anderen Proteinen und Lipoiden hervorgerufen wird. Dem eben Ausgeführten entsprechend sind auch zur Darstellung der Antigene bislang hauptsächlich solche Methoden angewandt worden, die in der Chemie und ihren Hilfswissenschaften üblich sind, vorzugsweise die Methoden der Kolloidchemie. Daß diese Methoden letzten Grundes nur zu ganz unvollständigen Aufklärungen führen

---

[1]) Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1902, 686, 918.

[2]) Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 31, 3. u. 4. Heft, S. 345.

konnten, liegt einesteils in der geringen Erkenntnis vom chemischen Aufbau der Eiweißkörper selbst begründet, andernteils aber auch an der meist großen Labilität des zu bearbeitenden Materials.

An Stelle der hier versagenden chemischen Trennungsmethoden müssen nunmehr die feineren biologischen Methoden treten, die beispielsweise an einem chemisch reinst dargestellten Körper noch zeigen können, daß an ihm verschiedene Eigenschaften vorhanden sind, beispielsweise eine toxische, hämolytische und fermentative.

Bei der chemisch physikalischen Darstellung der Toxine bedingt natürlich das Ausgangsmaterial in erster Linie den Untersuchungsgang. Im Nachfolgenden will ich zeigen, daß aus einem ungereinigten Ausgangsmaterial, dem Pollenprotein, das die eigentliche, heufiebererzeugende Toxinkomponente einschließt, durch genaues Eingehen auf die besonderen Eigenschaften der Pollen und des Pollentoxins, ein Giftkomplex dargestellt werden kann, der in seiner physiologischen Wirkung die bisher bekannten Heufiebertoxine um mehr als das 100fache übertrifft und welcher auch in seinem biologischen Verhalten viel weitgehendere Reaktionen auslöst als bisher möglich war.

I. Charakterisierung des Roggenpollentoxins.

Zur chemischen Charakterisierung der einzelnen Antigene sind eine Unmenge verschiedener Untersuchungsmethoden benutzt worden, die sich fast alle oder vorwiegend den kolloiden Charakter der Antigene zum Nutzen machten. Die häufigste Verwendung fand die Fällung durch Neutralsalze, nachdem namentlich durch die Arbeiten von Hoffmeister[1]) und seinen Schülern die Grenzen der Neutralsalzfällungen einzelnen Proteinen gegenüber festgesetzt waren. Am meisten kommen hier in Betracht Kochsalz, Magnesiumsulfat, Natriumsulfat und Ammoniumsulfat. Da es sich bei der Aussalzung nur um eine Verdrängung aus dem Lösungsmittel handelt, so gehören diese Verfahren zu den schonendsten der Antigendarstellung. Da aber zur wirksamen Ausfällung durch Neutralsalze hohe Konzentrationen bis zur völligen Sättigung der Giftlösungen nötig sind, so ist dieser Untersuchungsgang für Stoffe, die, wie das Pollentoxin an der empfindlichen menschlichen Schleimhaut des Auges geprüft werden, nicht gerade empfehlenswert, da es recht schwierig ist, durch Dialyse die letzten Spuren der anhaftenden Salze zu entfernen, wobei man aber Gefahr läuft, durch langdauernde Dialyse den Giftwert

[1]) Hoffmeister, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 24, 247, 1888.

herabzusetzen. Die fraktionierte Aussalzung mit Neutralsalzen gelingt leicht bei der Darstellung des Ricins, Abrins, Crotins, Pollentoxins und verschiedener Schlangengifte, da diese Giftstoffe sich zum Unterschiede von den bakteriellen Toxinen in einem nativ-eiweißhaltigen Milieu befinden, das native Eiweißkörper, Globulin und Albumin enthält, die namentlich dem Ammoniumsulfat gegenüber scharf abgegrenzte Eigenschaften haben.

So erklärt es sich, daß häufig von Toxalbuminen gesprochen wird, und zwar mit Recht, denn neuere Untersuchungen von Osborne, Mendel und Harris[1]) zeigen jedenfalls, daß die Annahme nicht unberechtigt ist, wenn sie beispielsweise das Ricin nach sorgfältigem Fraktionierungsversuche als Albumin ansprechen. Auch das Pollentoxin verhält sich nach dieser Richtung hin genau wie das Ricin.

Neben den Neutralsalzfällungen wurde dann vielfach Alkohol zur Fällung toxischer Eiweißkörper benutzt. Dieser Prozeß ist jedenfalls kein so harmloser als die Neutralsalzfällungen darstellen. Namentlich durch längere Einwirkung der Alkoholbehandlung geht die Löslichkeit der gefällten Stoffe erheblich zurück, was wahrscheinlich auf innerer Anhydridbildung des Eiweißmoleküls zurückzuführen ist; dementsprechend ist es bei Alkoholfällung durchaus erforderlich, rasch zu arbeiten, daß die gefällten Substanzen dem Alkoholeinfluß wieder entzogen werden. Die Alkoholfällung trifft natürlich sämtliche nativen, koagulablen Eiweißkörper, und was speziell die Gewinnung des Pollentoxins nach dieser Methode betrifft, so ist experimentell festgestellt, daß die durch Alkoholfällungen gewonnenen Proteine bei sachgemäßer Behandlung sowohl in ihrer Löslichkeit als auch in ihrer Giftigkeit hinter den Neutralsalzfällungen nicht zurückstehen.

Auch Säuren und Basen sind mit Erfolg zur Darstellung von Antigenen herangezogen worden. Die Säuren wirken bekanntlich so, daß ein großer Teil anhaftender indifferenter Eiweißkörper abgeschieden wird, so daß das Antigen in isolierterer Form zurückbleibt. Kyes und Sachs[2]) haben am Kobragift gefunden, daß dieses mit Salzsäure eine reversible Bindung eingeht, die im Gegensatz zum nativen Kobragift gegen längeres Erhitzen stabil bleibt. Kossel[3]) und Tichomiroff[4]) haben die eiweißfällende Wirkung der Nucleinsäure benutzt, um aus Ricin-, Diphtherie- und Tetanusgiftlösungen sehr wirksame Präparate darzustellen. Einen eigenartigen Untersuchungsgang hat Faust[5]) mit der Isolierung des Ophiotoxins aus Kobragift eingeschlagen, indem er biuretfreies Gift darstellte, das durch vorsichtige Behandlung mit Meta-Phosphorsäure von den biuretgebenden Körpern befreit worden war.

---

[1]) Osborne, Mendel und Harris, Amer. Journ. of Physiol. **14**, Nr. 3, 1905.

[2]) Kyes und Sachs, Berl. klin. Wochenschr. **1903**, Nr. 2 u. 4.

[3]) Kossel, Verhdl. d. Berl. physiol. Ges. **1893/94**, Nr. 4, 5, 6.

[4]) Tichomiroff, Zeitschr. f. physiol. Chemie **21**, 90.

[5]) Faust, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **61**, 236.

Durch Fällung mit Ammoniak hat Langer[1]) das Bienengift darzustellen versucht, indem er tropfenweise mit konzentriertem Ammoniak ausfällte, bis ein reichlicher Niederschlag erfolgte, der die wirksame Substanz enthielt. Durch wiederholte Auflösung und Wiederausfällen konnte das Gift noch weiter gereinigt werden. Das zuletzt erhaltene Produkt gab weder die typischen Eiweißreaktionen, noch die Schwermetallfällungen, sondern reagierte nur noch auf die empfindlichen Alkaloidreagenzien, so daß Langer vermutet, das wirksame Prinzip des Bienengiftes sei eine Base.

Auf das Pollentoxin wirken sowohl Säuren wie Basen, wie ich bereits früher festgestellt habe, schädigend ein, so daß diese Methoden zur Reindarstellung nicht in Frage kommen.

Durch die kolloide Natur der Antigene angeregt, versuchten verschiedene Autoren, wie Landsteiner[2]), Biltz u. a., die Antigene durch Absorptionswirkungen aus ihren Lösungen niederzuschlagen. Besonders Biltz und Traube[3]) haben in sehr bemerkenswerten Arbeiten die Bedeutung der Absorptionserscheinung, mithin der physikalischen Chemie, für die Immunitätsphänomene dargelegt. Die verschiedensten anorganischen und organischen Kolloide wurden zur Isolierung der Antigene verwendet. Besonders instruktiv gestaltet sich der Versuch von Stillmark und Cushney[4]), die am Ricin die Beobachtung einer äußerst leichten Absorbierbarkeit machten; schon Schütteln einer Lösung mit Fibrinflöckchen läßt fast alles Ricin an dem Fibrin haften, aus dem es dann durch Auswaschen mit schwacher Sodalösung wiedergewonnen werden kann. Auch Lösungen von Pollentoxin verhalten sich in ihrer Absorbierbarkeit ähnlich; Digerieren mit Fibrin läßt einen großen Prozentsatz des Giftstickstoffes aus der Lösung des Pollengiftes verschwinden.

Alle verwendeten Absorbentien, wie Aluminiumhydroxyd, Eisenhydroxyd, Knochenkohle, Kieselgur, Hefe und viele andere mehr, wirken natürlich nicht spezifisch, denn z. B. das kolloide Eisenhydroxyd mit seinen zweifellos basischen Affinitäten wirkt nicht anders als die rein dargestellte kolloide Kieselsäure mit sauren Gruppen. Dagegen sind die Absorptionen, wie beispielsweise die Komplementablenkung und die Ausflockungserscheinungen an Bakterien (Agglutination), rein spezifischer Natur.

Eine neuartige Methode, Antigene mit Hilfe von Lipoiden zu gewinnen, hat Kyes[5]) durch seine Lecithiddarstellung des Kobragiftes geschaffen; das so gewonnene Kobralecithid verhält sich physikalisch, chemisch und biologisch durchaus wie ein völlig neuer Körper, der, wie bereits betont ist, namentlich in seinen Lösungsverhältnissen weitgehend

---

[1]) Langer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 38, 381.

[2]) Landsteiner, Wiener klin. Wochenschr. 1904, 63.

[3]) Traube, Berliner klin. Wochenschr. 1911, Nr. 10.

[4]) Stillmark und Cushney, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 41, 439, 1898.

[5]) Kyes, Berliner klin. Wochenschr. 1908, 956, 982.

verändert worden ist. Diese Bindung von Lecithin an das Gift verleiht dem neuen Kondensationsprodukte starke hämolytische Eigenschaften, wie auch schon lange bekannt ist, daß bei den hämolytisch wirkenden Antigenen, wie dem Schlangen-, Skorpion-, Bienengift und den hämolytisch wirkenden Organextrakten, ein geringer Lecithinzusatz die hämolytische Kraft bedeutend erhöht.

Auch für das Pollentoxin sind diese Verhältnisse neuerdings untersucht worden, worüber weiter unten (im Teil III) berichtet werden wird.

Es hat auch nicht an Versuchen gefehlt, mit Hilfe von Fermenten die anhaftenden Eiweißkörper aus den gifthaltigen Lösungen zu entfernen, um so das Toxin rein zu gewinnen. Naturgemäß können derartige Eingriffe nur dann unternommen werden, wenn die Toxine relativ beständig sind, so daß die Verwendung von Fermentwirkungen in Anbetracht der Labilität der meisten Antigene eine sehr begrenzte ist. Vor allem sind hier die Phytotoxine zu nennen, die eine sehr große Widerstandskraft den proteolytischen Fermenten gegenüber zeigen. Jacoby[1]) und Hausmann[2]) haben mit Erfolg versucht, reine Ricin- und Abrinpräparate mit Hilfe der Trypsinverdauung darzustellen. Das so von Ballasteiweißstoffen weitgehendst befreite Gift gibt nicht mehr die Biuretreaktion, dagegen zeigen einige Alkaloidreagenzien noch ein positives Resultat. Ferner versuchte Brieger, durch Papayotinverdauung zu einem eiweißfreien Präparat zu gelangen. Seine Versuche verliefen aber nicht so eindeutig, wie die von Jacoby und Hausmann, da seine Endprodukte alle noch deutliche Eiweißreaktionen gaben. Auch das Pollentoxin gehört, wie ich früher festgestellt habe, zu denjenigen Toxinen, die eine starke Resistenz gegenüber Eiweißenzymen aufweisen. Diese Resistenz ist aber keine absolute, denn länger dauernde Einwirkung konzentrierterer Trypsinlösungen verursachen zwar keine völlige Aufhebung, wohl aber eine erhebliche Schwächung der toxischen Komponente. Aus diesem Grunde konnte ein länger dauernder Fermentversuch mit künstlich zugesetzten Trypsinpräparaten nicht zum Ziele führen. Dieses Hindernis habe ich dadurch zu umgehen versucht, indem ich nicht die käuflichen, äußerst stark wirkenden proteolytischen Präparate zur Entfernung des Ballasteiweißes verwandte, sondern die schwächere proteolytische Kraft der Pollen selbst ausnutzte, um zu möglichst gereinigten Substanzen zu gelangen.

Die bisherige Gewinnung des Pollentoxins nach der Vorschrift von Dunbar[3]) bestand in einer Extraktion der mechanisch zertrümmerten Pollen mit physiologischer Kochsalzlösung und Ausfällen der gesamten Eiweißstoffe und aller übrigen fällbaren Substanzen durch Alkohol. Es stellt ein weißes

---

[1]) Jacoby, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 46, 28.

[2]) Hausmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 134, 1902.

[3]) Dunbar, Berliner klin. Wochenschr. 1903, 537, 567, 596.

Pulver dar, das alle charakteristischen Eiweißreaktionen gibt, neben geringeren Reaktionen auf Kohlehydrate. Diese bestehen zum größten Teil aus Stärke, die Dunbar[1]) in den meisten Pollenkörnern von Gramineen in Form von bakterienähnlichen Stäbchen nachgewiesen hat; diese mechanisch mitgerissenen Stärketeilchen sind nicht ohne Bedeutung für die Toxizität und das weitere biologische Verhalten des so gewonnenen Pollenproteins, worauf ich noch ausführlicher eingehen werde. In einer früheren Arbeit habe ich dann auf Veranlassung Dunbars[2]) das von ihm dargestellte Pollenprotein einer eingehenden Analyse unterworfen und bin zu dem Resultat gekommen, daß das Pollentoxin zu den Toxalbuminen zu rechnen ist. Auch dieses Präparat gab noch alle typischen Eiweißreaktionen, ließ jedoch die Anwesenheit von Kohlehydraten vermissen. In seiner physiologischen Wirksamkeit war es etwa doppelt so stark als das ursprüngliche Pollenprotein; es ist durch Neutralsalze, wie Ammoniumsulfat, aussalzbar, empfindlich gegen Säuren und Alkalien und relativ stabil gegen proteolytische Fermentwirkungen. Als Eiweißkörper vom Albumincharakter ist es ferner schon in destilliertem Wasser löslich, während die unwirksamen Globuline des Pollenproteins erst von Kochsalzlösung gelöst werden. In den Pollenextrakten konnten ferner die verschiedenartigsten Fermentwirkungen, unter andern auch proteolytische Fermente, nachgewiesen werden. Auf alle diese Befunde stützt sich die Neugewinnung des wirksameren Pollentoxins, für die folgende Vorschrift einzuhalten ist. Die lufttrockenen Gramineenpollen (im vorliegenden Falle habe ich Roggenpollen verwendet) werden in einer Porzellankugelmühle während 12 Stunden zu feinstem weißlichen Mehl zerrieben und im Porzellanmörser mit etwa der 10fachen Menge sterilem, destilliertem Wasser zu einem gleichmäßigen Brei verrührt. Nach Überführung in einen sterilen Glaskolben werden auf je 10 g des Ausgangsmaterials 10 ccm einer 1 °/₀igen Diastaselösung (Präparat Grübler) hinzugefügt,

---

1) Dunbar, Zur Ursache und spezifischen Heilung des Heufiebers. München und Berlin 1903. R. Oldenburg.

2) Dunbar, Berliner klin. Wochenschr. **1903**, Nr. 24—26; ebenda **1905**, Nr. 26, 28, 30; Deutsche med. Wochenschr. **1911**, Nr. 13.

um die für das spätere biologische Verhalten höchst nachteilige Stärke zu entfernen. An Stelle der früher verwendeten Kochsalzlösung wird destilliertes Wasser genommen, um die nur als Ballasteiweißkörper wirkenden unwirksamen Globuline von vornherein nicht in den Extrakt gelangen zu lassen. Wenn nach mehrstündiger Bebrütung bei 37° die Stärke ganz oder fast völlig aus der Lösung verschwunden ist, wird die wässerige Pollenaufschwemmung zwecks ausgiebiger Extraktion der toxischen Albumine für weitere 12 bis 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Nunmehr wird von den ausgelaugten Zellen abzentrifugiert und die Albumine aus ihrer wässerigen Lösung mit der 8 bis 10fachen Menge Alkohol gefällt. Bei dieser Prozedur

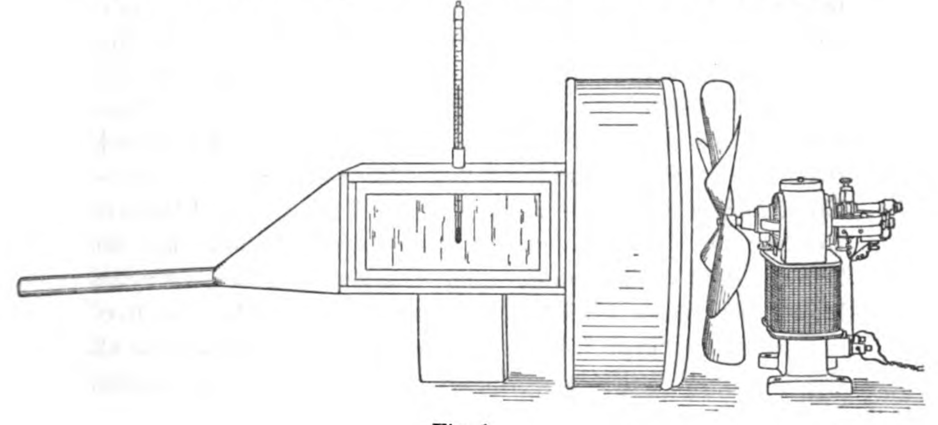


Fig. 1.

werden auch die Enzyme mit in den Niederschlag gerissen. Es ist zweckmäßig, die Alkoholbehandlung tunlichst abzukürzen, obgleich eine stärkere Schädigung, wie oben schon auseinandergesetzt ist, gerade für das Pollentoxin nicht eintritt. Die Trocknung dieses Albuminniederschlages und die Entfernung der letzten Spuren von anhaftendem Alkohol darf nicht bei höherer Temperatur vor sich gehen, sondern muß bei Zimmertemperatur möglichst rasch im trockenen Luftstrome unter Verwendung eines Aspirators geschehen. Zu diesem Zwecke habe ich einen kleinen Apparat konstruiert, der, wie Fig. 1 zeigt, überall leicht aufzustellen ist und mit dem es gelingt, mit Leichtigkeit in einer Stunde mehrere 100 ccm Flüssigkeit ohne Temperaturerhöhung zu verdunsten. Das auf diese Weise getrocknete

Präparat stellt gelbliche, wie Seide glänzende Schüppchen dar, die, wohl infolge geringer Menge mit in Lösung gegangener Globuline, in Wasser nicht quantitativ wiedergelöst werden können. Die weitere Behandlung dieser wässerigen Lösung aus dem Pollenalbumineiweiß gründet sich darauf, daß in diesem Albumin auch die Pollenfermente enthalten sind, namentlich die proteolytischen. Diese Fermente müssen jetzt längere Zeit auf die Albuminlösung einwirken, und zwar bei Eisschranktemperatur während mindestens 8 Tagen, um so eine Art Selbstverdauung der Albumineiweißstoffe herbeizuführen. Je länger dieser enzymatische Prozeß andauert, desto toxischer werden die Endpräparate, so daß auch für das Pollentoxin die Annahme nicht von der Hand zu weisen ist, daß es eine salz- oder esterartige Bindung an Albumineiweißstoffe darstellt, die durch diesen verhaltenen enzymatischen Prozeß gelockert oder gesprengt werden. Die endgültig so gewonnene toxische Komponente aus dem Pollenprotein gibt zwar noch die Biuretreaktion, ist also entweder selbst oder haftet noch an einem Eiweißkörper, gibt aber nicht mehr die Millonsche und Molisch-Reaktion, so daß jedenfalls ein Eiweißkörper vorläge, dem die Tyrosin- und Kohlehydratgruppe vollständig fehlen. Physiologisch ist dieses Produkt, an einer ganzen Reihe von Heufieberpatienten geprüft, übereinstimmend 100 mal wirksamer als das frühere Pollenprotein. Spritzt man Kaninchen mit diesem hoch wirksamen Toxin intravenös, so zeigt sich schon nach wenigen Injektionen ein außerordentlicher Anstieg von Antikörpern, der im Komplementbindungsversuche bis zur Verdünnung 1 : 2000000 positiv verlief. Eingehender wird über diese Versuche Herr Dr. Gaethgens berichten.

II. Fermente in Roggenpollen.

Die heutige Auffassung der Fermente als Katalysatoren ist wohl allgemein akzeptiert. Ein Ferment ist demnach eine Substanz, die von der lebenden Zelle erzeugt wird und imstande ist, chemische Prozesse, die auch von selbst, aber mit kaum meßbarer Geschwindigkeit verlaufen würden, auszulösen und in beschleunigter Weise zu Ende zu führen. Von den Fermenten als solchen wissen wir recht wenig, weil wir keine charakteristischen Reaktionen der Fermente kennen, die im

analytisch-chemischen Sinne verwertbar wären. Wir müssen uns daher vorläufig auf die Fermentwirkungen beschränken und diese Wirkungen mit den üblichen Methoden der Chemie und Physik messen. Die Fermente werden also eingeteilt nach dem Chemismus, der durch ihre Gegenwart begünstigt wird.

In einer früheren Arbeit „Zur Kenntnis des Roggenpollens[1]) und des darin enthaltenen Heufiebergiftes" habe ich bereits den Nachweis von Fermenten im Roggenpollen führen können. Es gelang damals, proteolytische, diastatische und saccharifizierende Fermente qualitativ nachzuweisen. Die Methoden zur Messung der verschiedenen Fermentwirkungen sind seither aber so ausgebaut und verfeinert worden, daß ich unter Heranziehung dieses neuen Hilfsmittels die verschiedenen Fermente im Roggenpollen noch einmal zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht habe.

Die zur Verfügung stehenden Roggenpollen wurden in der Kugelmühle zu Staubmehl vermahlen, wobei die Farbe von goldgelb in weißgelblich wechselt und ein kräftiger aromatischer Geruch entsteht. 10 g dieses feinen Mehles werden unter Zusatz von Toluol, das zur Ausschaltung bakterieller Nebenwirkungen für alle nachfolgenden Versuche ausschließlich verwendet wurde, mit der 10fachen Menge sterilem destilliertem Wasser 24 Stunden bei 37° extrahiert und die klare zentrifugierte Lösung für die Fermentuntersuchungen benutzt. Ließ ich die vermahlenen Roggenpollen längere Zeit an einem trockenen und dunklen Orte stehen, so trat bald ein sich verstärkender säuerlicher Geruch auf, der zweifellos enzymatischen Vorgängen sein Entstehen verdankt. Die Vermutung, daß es sich um Abspaltung einer organischen Säure, der Buttersäure, handelt, bestätigte sich im Laufe der folgenden Untersuchungen. Der Kochsalzextrakt aus diesen Pollen reagierte stark sauer und roch gleichfalls nach Buttersäure. Diese kann nur aus dem Fett oder Wachs, das in äußerst dünner Schicht viele Pollen umgibt, durch lipolytische Tätigkeit gebildet worden sein. Ein weiter unten ausgeführter Versuch bestätigte diese Vermutung.

---

[1]) Kammann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 346. — Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1906, I. — Derselbe, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. 11, Heft 5, S. 659.

1. Bestimmung von Proteasen.

Die Prinzipien dieser Fermentbestimmungen sind zweierlei Art; entweder verfolgt man das Verschwinden einer gegebenen meßbaren Eiweißmenge, oder man sucht nach dem Auftreten typischer Spaltprodukte. Ein pepsinähnliches Ferment ließ sich im Roggenpollenextrakt nicht nachweisen, wohl aber ein tryptisch wirkendes; letzteres ließ sich durch die Abspaltung von Tyrosin aus Seidenpepton erkennen. Der Versuch verlief so, daß zu einer 10%igen Seidenpeptonlösung die gleiche Menge Roggenpollenextrakt unter Zusatz von Toluol 48 Stunden bei 37° gehalten wurde. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure wurde das Filtrat auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand in heißem ammoniakalischem Alkohol aufgenommen. Diese Lösung wurde wiederum eingeengt und zeigte nach dem Abkühlen einen reichlichen Ausfall typischer Tyrosinnadeln. In gleicher Weise zeigte sich ein Trypsingehalt bei der Einwirkung des Extraktes auf reinstes Casein. Nach 48stündiger Einwirkung bei 37° wurde das unangegriffene Casein ausgefällt und im Filtrat die Biuretreaktion angestellt, die stark positiv ausfiel.

2. Kohlenhydrate abbauende Fermente.

a) Diastasen.

Das Vorhandensein von stärkeangreifenden Fermenten war schon durch frühere oft gemachte Beobachtungen wahrscheinlich geworden durch das allmähliche Verschwinden der Stärkestäbchen in den Gramineenpollen. Ganz frisch gesammelte Roggenpollen zeigen nach Zusatz eines Tropfens Jodlösung unter dem Mikroskop fast schwarz gefärbte Stärkestäbchen. Untersucht man nach längerer Zeit diese Roggenpollen wiederum, so zeigt sich, daß viele von ihnen nur noch eine violette bis rosa Färbung der Stärkestäbchen zeigen, während andere Pollenkörner schon gänzlich stärkefrei sind. Der Versuch bestätigte die Anwesenheit eines diastatischen Fermentes, indem 2 ccm des verwendeten Roggenpollenextraktes imstande waren, 1 ccm einer 1%igen Stärkelösung während einer 6stündigen Einwirkung bei 37° völlig zu verzuckern.

b) Glykolytisches Enzym.

Zur Erkennung dieses Fermentes wurde eine 5 %ige Traubenzuckerlösung benutzt, die durch Einwirkung des konzentrierten Roggenpollenextraktes den Traubenzucker unter Abspaltung von Kohlensäure zerstörte. Die Wirkung dieses Fermentes in Roggenpollen ist nur gering, da 5 ccm des verwendeten Extraktes imstande waren, nach 12stündiger Einwirkung bei 37° nur 2,2 ccm Kohlensäure aus der Traubenzuckerlösung in Freiheit zu setzen.

3. Nucleasen.

Als Nachweis einer Nucleasewirkung wird gewöhnlich nucleinsaures Natrium benutzt, das unter Bildung von Phosphorsäure und Purinbasen zerfällt. Der Nachweis beider Spaltprodukte gelang jedoch in keinem Falle.

4. Katalase.

Katalase sind Fermente mit der spezifischen Fähigkeit Wasserstoffsuperoxyd in Sauerstoff und Wasser zu zerlegen, sie gleichen in dieser Wirkung am meisten den kolloiden anorganischen Katalysatoren. Bei der Einfachheit der chemischen Katalasewirkung ist ihre Anwesenheit leicht nachzuweisen. Man benutzt einfach die Blaufärbung einer geeigneten Guajactinktur durch den aus dem Wassersuperoxyd entbundenen Sauerstoff. Der Roggenpollenextrakt zersetzt Wasserstoffsuperoxyd ziemlich intensiv unter starker Schaumbildung und gibt infolgedessen eine sehr stark positive Guajacreaktion.

5. Lipase.

Der Nachweis von Fett- und Esterspaltungen wurde bislang fast stets durch Titration der entstandenen Säure geliefert. Diese Methode ist aber zur eindeutigen Feststellung einer derartigen fermentativen Wirkung wenig geeignet, da die gewonnenen Werte bei kurzer Versuchsdauer meist so gering sind, daß sie kaum außerhalb der Fehlergrenze liegen, oder aber bei längerer Versuchsdauer durch die mit den Bestimmungsmethoden verbundenen Fehlerquellen geprüft werden. Diese Methode ist also nur dann einigermaßen einwandfrei, wenn in kürzerer Versuchsdauer die Titration der entstandenen Säure

einen großen Wert liefert. Diesen Mangel einer brauchbaren Methode zum Nachweis von Esterspaltungen haben Rona und Michaelis[1]) dadurch beseitigt, daß sie die Änderung der Oberflächenspannung als Maß für den Verlauf des lipolytischen Prozesses benutzten. Während z. B. die Glycerinester der Buttersäure, Monobutyrin resp. Tributyrin zu den Stoffen gehören, die die Spannung des reinen Lösungsmittels schon in sehr geringer Konzentration stark erniedrigen, ändern die entstehenden Spaltprodukte, in diesem Falle die Essigsäure und das Glycerin, die Oberflächenspannung nur ganz unbedeutend. Auf Grund von eingehenden Vorversuchen schufen Rona und Michaelis hiermit eine Methode, die jede Änderung der Oberflächenspannung von Monobutyrinlösung auf eine fermentative Spaltung zurückführen läßt.

Mit Hilfe dieser Methode wurde auch in Roggenpollen ein stark lipolytisches Ferment nachgewiesen. Zum Versuch benutzt wurde eine gesättigte Lösung von Monobutyrin Merck. 50 ccm dieser Lösung wurden mit 5 ccm Roggenpollenextrakt versetzt und fortschreitend bei stets gleichbleibender Temperatur von 21° C die Oberflächenspannung durch Tropfenzählung ermittelt. Es ergaben sich folgende Werte:

Zeit	Tropfenzahl	Zeit	Tropfenzahl
sofort	95	1 Std.	73
5 Min.	85	4 „	68
15 „	80	5 „	67
30 „	75	12 „	68

Hieraus resultieren folgende Kurven: Kurve I zeigt den Verlauf mit unerhitztem, Kurve II als Kontrolle mit erhitztem Extrakt.

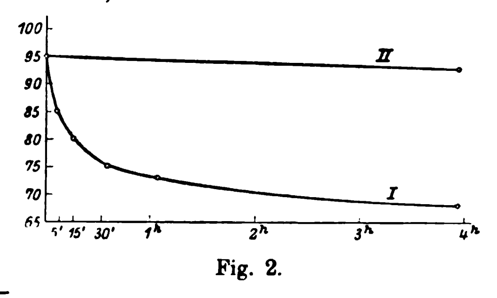


Fig. 2.

[1]) Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 33, Heft 5 u. 6, S. 463. — Dieselben, diese Zeitschr. 33, Heft 1, 2, 3, S. 190.

Die Wirkung des lipolytischen Fermentes ist also eine sehr intensive und schnelle, denn sie erreicht bereits nach 4 Stunden ihr Maximum. Dementsprechend konnte auch durch den zweiten Nachweis lipolytischer Wirksamkeit, durch die Titrierung der entstandenen Buttersäure, der Nachweis einer Lipase geführt werden. Nach 4stündiger Einwirkung bei 37° vermochten 5 ccm des Roggenpollenextraktes aus 50 ccm gesättigter wässeriger Butyrinlösung eine Säuremenge abzuspalten, die zur Neutralisation, nach Abzug der für die Kontrollen notwendigen Korrekturen, 7,5 ccm $^{n}/_{100}$-Natronlauge verbrauchte.

Eine Lecithinase, Tyrosinase, Lactase konnte im Roggenpollenextrakt nicht nachgewiesen werden.

Vorhanden sind also Proteasen, Diastasen, Katalasen und Lipasen.

III. Die hämotoxische Komponente im Roggenpollentoxin.

Das Roggenpollentoxin ist ein polytropes Gift, das sich aus mindestens zwei Monotropentoxinen zusammensetzt, dem eigentlichen, heufiebererregenden Partialgift und dem hämolytischen Prinzip. Für weitere vermutete Partialgifte konnte bislang noch nicht der strikte Beweis erbracht werden.

Die Existenz dieser beiden toxischen Prinzipien läßt sich durch die Möglichkeit beweisen, eine dieser Giftwirkungen abzuschwächen oder zu beseitigen, ohne die andere zu schädigen. So ist beispielsweise das eigentliche heufiebererregende Toxin gegen Proteasen, wie Pepsin, Trypsin und Papain ziemlich beständig, während Pepsinsalzsäure die hämolytische Komponente schnell zerstört. Schon längeres Verweilen bei 37° im Brutschrank läßt eine deutliche Schädigung des hämolytischen Partialgiftes erkennen, so daß es am zweckmäßigsten ist, alle in vitro Versuche mit diesem Hämolysin bei Zimmertemperatur ablaufen zu lassen. Ein weiterer Beweis für die Existenz dieser Partialfunktionen liegt darin, daß sich z. B. das hämolytische Prinzip durch Blutkörperchenaufschwemmung absättigen läßt, so daß ein Toxin mit ausschließlich heufiebererregenden Eigenschaften zurückbleibt.

Das Verhalten dieses zweiten Einzeltoxins, des hämolytischen, werde ich hier etwas eingehender besprechen; es hat große Ähnlichkeit mit dem bereits bekannten hämotoxischen

Prinzip aus dem Kobragift, das, schon älteren Autoren bekannt, erst durch die Untersuchungen von Kyes[1]) experimentell geklärt wurde.

Nach Kyes[2]) verhält sich das Hämolysin des Schlangengiftes wie die bekannten Hämolysine des Spinnen-, Kröten- und Aalgiftes. Seine hämolytische Funktion ist an das Zusammenwirken zweier Komponenten gebunden. Im Schlangengift selbst ist nämlich ein Ferment vorhanden, eine Lecithinase, die das eigentlich wirksame Prinzip der Hämolyse darstellt. Dieses Ferment macht aus dem hinzugefügten Lecithin, das Kyes[3]) als Aktivator angesprochen hat, das außerordentlich stark hämotoxisch wirkende Mono-oleyl- resp. Mono-stearyl-Lecithin frei.

Ganz ähnliche Verhältnisse liegen beim Roggenpollentoxin vor. Auch dieses ist nicht imstande, aus sich heraus in vitro Blutkörperchen zu lösen, sondern muß erst durch Lecithinzusatz oder ein dem Lecithin nahestehendes Lipoid, wie es sich in jedem Normalserum vorfindet, „aktiviert" werden.

Der Pollenhämotoxinamboceptor ist einigermaßen thermostabil, da er erst durch längere Erhitzung auf über 75° geschädigt wird. Einwirkung von Säure und Alkali zerstören ihn schnell und Pepsinsalzsäure hat ebenfalls einen vernichtenden Einfluß. Der Amboceptor kann quantitativ aus seinen Lösungen an Blutkörperchenbrei gebunden werden, wie folgender Versuch beweist:

Benutzt wurden 5%ige Rinderblutaufschwemmung, eine Pollentoxinlösung 1:100 und eine Lecithinsuspension 1:1000.

Tabelle.

Glas Nr.	5%ige Rinderblutkörperchen ccm	Toxin ccm
1	1	0,4
2	1	0,4
3	1	0,4
4	1	0,4
5	1	0,4

[1]) Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 42 u. 43.
[2]) Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 19.
[3]) Kyes, diese Zeitschr. 4, 99, 1907.

Nach 15 minutigem Digerieren bei Zimmertemperatur wurde abzentrifugiert, der Blutkörperchenrückstand mit der gleichen Menge isotonischer Kochsalzlösung versetzt und Lecithinsuspension hinzugesetzt.

Glas Nr.	5 %ige R.-Bl. ccm	Toxin ccm	Lecithin ccm	Resultat nach 30 Min. bei 37°
1	1	0,4	0,5	komplett
2	1	0,4	0,4	"
3	1	0,4	0,3	"
4	1	0,4	0,2	fast komplett
5	1	0,4	—	—
6	1	—	0,5	—

Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde zur Prüfung auf nicht gebundene Amboceptoren wieder mit 5%iger frischer Rinderblutkörperchen-Aufschwemmung digeriert und die oben verwendeten Mengen Lecithin hinzugesetzt. Nunmehr trat keine Hämolyse ein, wie der Versuch beweist:

Tabelle.

Glas Nr.	5 %ige R.-Bl. ccm	Toxinzentrifugat v. Vers. 1 ccm	Lecithin ccm	Resultat nach 30 Minuten bei 37°
1	1	0,4	0,5	—
2	1	0,4	0,4	—
3	1	0,4	0,3	—
4	1	0,4	0,2	—
5	1	0,4	0,1	—

Der Amboceptor ist also quantitativ an die Erothrycyten gebunden worden.

An Stelle der Rinderblutkörperchen können auch diejenigen jeder beliebigen Tierart treten; es wurden alle geprüften mehr oder weniger hämolysiert. Ob dieses darauf zurückzuführen ist, daß die verschiedenen roten Blutkörperchen, die infolge ihres wechselnden spärlichen Lecithingehaltes ebenfalls inaktivierend wirken können, das Lecithin bald in einer disponiblen, bald in einer festen verankerten Form enthalten, lasse ich dahingestellt. Tatsache ist jedenfalls, daß bei früheren hämolytischen Versuchen mit Roggenpollengift die Erythro-

cyten von menschlichen Individuen, die zu Heufieber disponiert waren, weit leichter vom Toxin gelöst wurden, als diejenigen normaler Personen. Hiernach müßte angenommen werden, daß in der Blutart normaler Personen das Lecithin festgebunden ist, so daß es sich mit dem Gift nicht zu einer komplexen hämolysierenden Verbindung vereinigen kann; es findet keine Blutlösung statt. Ist die Bindung des intracellulären Lecithins aber locker, wie es bei den Erythrocyten des Heufieberdisponierten der Fall sein könnte, so vereinigt es sich mit dem Hämotoxin und aktiviert dieses; die betreffende Blutart ist empfindlich.

Weit stärker aktivierend als reine Lecithinaufschwemmungen wirken geringe Serumzusätze. Auch hier ist die aktivierende Kraft verschiedener Sera eine verschiedene, abhängig von dem Gehalt der zur Aktivierung notwendigen Lipoidmengen. Die Ausschläge sind so quantitativ meßbar und liefern einen guten Maßstab für die quantitativen Mengenbestimmungen dieser aktivierenden Stoffe. Nach meinen Befunden wirken Rinderserum, Meerschweinchenserum und Schweineserum am besten aktivierend auf den hämolytischen Amboceptor, etwas weniger gut Pferdeserum, schlechter Hammel- und Kaninchenserum.

Durch Zusatz von spezifischem Heufieberserum, hergestellt durch Injektion verschiedener Gramineenextrakte in Pferde, konnte natürlich keine Aufhebung der hämolytischen Wirkung erzielt werden, da die Affinität des Serumlipoids zum Amboceptor eine starke zu sein scheint und stets Hämolyse eintritt. Eine Entfernung der Lipoide aus dem spezifischen Serum und nunmehrige antihämotoxische Prüfung lieferte keine eindeutigen Resultate, da es äußerst schwer ist, durch bloße Ätherschüttelung oder sonstige nicht eingreifende Methoden dem Serum alle lipoiden Stoffe zu entziehen.

Auf eine sehr bequeme Weise kann man leicht zum komplexen Hämolysin des Roggenpollentoxins kommen, wenn man die fein vermahlenen Roggenpollen von vornherein mit einer ganz verdünnten Lecithinsuspension auszieht und später durch Kochsalz isotonisch macht. Nunmehr ist der Extrakt, dessen Stärke für jeden Versuch wechselt und genau bestimmt werden muß, für die hämolytischen Versuche in vitro brauchbar, vorausgesetzt, daß nicht zu viel Stärke aus den Pollenkörnern in

Lösung gegangen ist. Es hat sich nämlich die merkwürdige Tatsache herausgestellt, daß stärkehaltiges Pollentoxin sich äußerst schwer oder gar nicht durch die genannten Lipoide aktivieren läßt. Es scheint sich auch hier um einen typischen Fall kolloider Schutzwirkung zu handeln, derart, daß der Aktivator durch die Wirkung des Schutzkolloids gar nicht zur Bindung an den hämotoxischen Amboceptor gelangt. Um diese Lösung von Stärke oder auch größere Quellung von Stärkestäbchen zu vermeiden, geschieht die Extraktion am besten nicht bei höherer Temperatur, sondern in etwas längerem Zeitraum im Eisschrank, wobei die letzten Spuren, wenn nötig, noch durch einen geringen künstlichen Diastasezusatz beseitigt werden können.

Zusammenfassung.

1. Es wurde gezeigt, daß unter Berücksichtigung der besonderen Eigenschaften der Roggenpollen ein Pollentoxin gewonnen werden kann, das neben einer stark erhöhten spezifischen Wirksamkeit besondere biologische Eigenschaften aufweist.

2. In den Roggenpollen kommen an Enzymen, Proteasen, Diastasen, Katalasen und Lipasen vor.

3. Das Roggenpollentoxin enthält einen hämotoxischen Amboceptor, der nach Aktivierung durch Lecithin und Serumlipoide auf Blutkörperchen hämolysierend wirkt.

Über die Adsorption durch Tone. III.

Von

Paul Rohland.

(Aus dem Institut für Elektrochemie und technische Chemie der Technischen Hochschule zu Stuttgart.)

(Eingegangen am 26. August 1912.)

Kolloidtone adsorbieren nach meinen bisherigen Untersuchungen[1])

1. kolloid gelöste Substanzen;

2. Farbstoffe komplizierter Zusammensetzung, von tierischer, pflanzlicher und künstlicher Herkunft, die nach neueren Arbeiten in konzentrierteren Lösungen ebenfalls als polymerisiert-kolloid anzusehen sind[2]);

3. CO_3'', HCO_3'-Ionen aus kohlensauren, B_4O_7''-Ionen aus tetraborsauren Salzen vollständig, PO_4''-Ionen aus phosphorsauren Salzen zum Teil, wobei zugleich ein Austausch der Kationen dieser Lösungen gegen die in den Tonen verbunden ist;

4. Ungesättigte Kohlenwasserstoffe von der Zusammensetzung C_nH_{2n}, C_nH_{2-2} usw., wobei allerdings eine chemische Bindung stattfindet. Der Umstand, daß kolloide Substanzen von solchen Tonen und Kaolinen adsorbiert werden, kann therapeutischen Zwecken nutzbar gemacht werden.

Schließlich adsorbieren solche Kolloidtone auch Gase insbesondere Rauchgase, und Gerüche aller Art. Dieses Phänomen führt zu einer neuen Vermutung über die Tonbildung und Kaolinisierung, wo sie primär entstanden sind.

---

[1]) Diese Zeitschr. 1909 bis 1911.

[2]) Vgl. P. Rohland, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **1912**, 116 über die Adsorptionsfähigkeit der Hydroxyde des Si, Al, Fe.

Ich habe schon darauf hingewiesen[1]), daß man die Kaolinisierung nicht verallgemeinern, nicht auf eine Formel bringen soll; man soll vielmehr von den drei aufgestellten Theorien der rein „physikalisch-chemischen“, nach der ausschließlich Kohlensäure und Wasser die Ton- und Kaolinbildung aus den granitischen Urgesteinen hervorgerufen haben, der „Humintheorie“[2]), nach der außerdem Huminstoffe auch moorige Substanzen dabei mitgewirkt haben, und der „postvulkanischen“, nach der pneumatolitischen und pneumatohydatogenen Prozessen diese Umwandlung zuzuschreiben ist, für den einzelnen Fall die passendste und entsprechendste auswählen, aber nicht diesen Vorgang in das enge Prokrustesbett einer ganz bestimmten Theorie hineinpressen wollen.

Nun ist bisher noch keine Vermutung darüber ausgesprochen worden, woher der charakteristische Tongeruch und Geschmack stammt; er rührt wahrscheinlich von einst organisierter Materie her, auch der Gehalt an organischen Stoffen, der einschließlich des anorganischen Glühverlustes, des Wassers und der Kohlensäure, bis zu 13 und 15 % in den Tonen und Kaolinen betragen kann, weist darauf hin.

Da liegt nun die Vermutung nahe, daß bei dieser Kaolinisierung einst kleine Lebewesen, vielleicht Bakterien, mitgeholfen haben; den Geruch der verwesenden organisierten Materie hat aber der Ton bzw. Kaolin seinerzeit adsorbiert und durch Jahrhunderte konserviert. Freilich ist das auch alles, was diese Bakterien hinterlassen haben.

Es sei noch bemerkt, daß man gelegentlich Rohkaoline trifft, die keinen spezifischen Tongeruch aufzuweisen haben; doch tritt dieser hervor, wenn der Kaolin längere Zeit hindurch mit Wasser oder besser mit irgendeiner Lauge zusammengebracht wird.

Der Kaolin ist in bezug auf Adsorptionsfähigkeit von Gerüchen und Gasen das empfindlichste Material, das wir besitzen.

---

[1]) A. Hartleben, Die Tone 1909.

[2]) Ein gutes Beispiel für die Entstehung des Kaolins auf diesem Wege bildet das Freiherrlich von Schönbergsche Kaolinlager in Hohburg bei Wurzen (Kgr. Sachsen). Dort lagert die Braunkohle und kohliger Ton direkt über dem Kaolin. Auch der Gehalt an Eisenoxydulverbindungen im Rohkaolin weist darauf hin.

Und merkwürdigerweise kann dieser eigentümliche Tongeruch auf andere Substanzen übertragen werden. Schüttelt man Ton oder Kaolin mit einer Lösung von Eisensaccharat von der Zusammensetzung $x\,Fe_2(OH)_6 + y\,C_{12}H_{22}O_{11}$, so adsorbiert diese Lösung den Tongeruch, während ihn der Ton verloren hat. Ebenso kann er auf diesem Wege auf eine Lösung von Ammoniak übertragen werden.

Alle diese Eigenschaften des Kolloidtons machen ihn geeignet, städtische Abwässer und Fabrikwässer damit zu reinigen, zu klären und geruchlos zu machen[1]).

---

[1]) Vgl. P. Rohland, Das Kolloidtonreinigungsverfahren für städtische Ab- und Fabrikwässer. Chem. Ind. 33, 519, 1910.

Über die Ausscheidung des Wassers bei der Atmung.

Von

G. Galeotti.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der K. Universität zu Neapel.)

(Eingegangen am 26. August 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Bis jetzt hat man allgemein angenommen, daß die ausgeatmete Luft mit Wasserdampf gesättigt sei, und daß deshalb der Wasserverlust durch die Lungenwege nur vom Rhythmus der Atmung und von der größeren oder geringeren Ventilation der Lungen abhänge.

Nachdem dieses Prinzip a priori aufgestellt war, haben sich wenige Forscher damit beschäftigt, nachzuprüfen, ob es wirklich richtig sei, und die Studien über den Wasseraustausch haben auch in dieser Hinsicht bis jetzt keine Klarheit über den wirklichen Sachverhalt gebracht.

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich einige die Literatur des Themas betreffenden Angaben gemacht, deren Wiederholung hier als überflüssig erscheint.

In dieser Arbeit ergaben nun die direkten Bestimmungen der ausgeatmeten Wassermenge beträchtliche Schwankungen, wodurch ich veranlaßt wurde, diesen Teil der Atmungsfunktion genauer zu studieren.

Untersuchungsmethode.

Ich verwendete einen Apparat, der mir gestattete, die Menge des mit dem Atem abgegebenen Wasserdampfes mit hinlänglicher Genauigkeit zu bestimmen.

Die Methode besteht darin, daß man die ausgeatmete Luft durch Röhren mit Calciumchlorid hindurchgehen läßt, und so mittels Wiegen das in der Luft enthaltene Wasser bestimmt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 41, H. 3/4, S. 268 und Atti dei Laboratori Scientifici Angelo Mosso sul Monte Rosa 4, 15.

Der von mir ersonnene Apparat zeigt nur die folgende Besonderheit: ein System von Klappen, das auf die kleinsten Dimensionen gebracht ist und so erwärmt werden kann, daß sich das Wasser des Atems nicht darin kondensiert.

Fig. 1 stellt schematisch diesen Klappenapparat dar, der in Metall konstruiert ist. *a* ist eine Röhre, die zwischen die Lippen genommen wird und durch die man atmet; bei der Inspiration dringt die Luft durch die Röhre *b* ein, hebt die Klappe *c* und gelangt zu den Lungen; bei der Exspiration schließt sich die Klappe *d* und auf diese Weise geht die ausgeatmete Luft in die drei Röhren *e, e, e*. Die ganze Vorrichtung ist in einen Metallkasten *f* eingeschlossen, in dem eine Temperatur von 40 bis 45° erhalten wird.

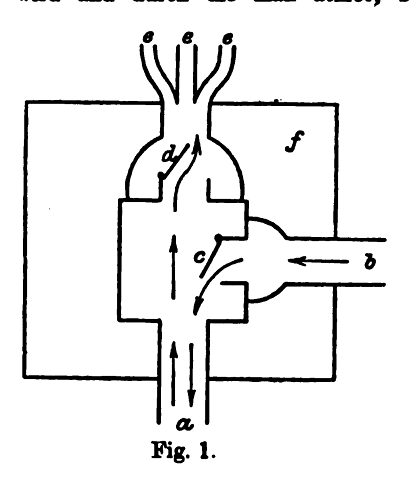


Fig. 1.

Die Klappen *c* und *d* bestehen aus einem kleinen Ringe aus Messing, über dem eine dünne tierische Membran ausgespannt ist, die sich der Öffnung der darunter befindlichen Röhre anpaßt und sie vollständig verschließt. Diese Klappen sind derart eingestellt, daß sie die Öffnung, für die sie bestimmt sind, einfach durch ihr Gewicht verschließen und durch den Druck der Luft aufgerichtet werden. Das Spiel dieser Klappen ist so leicht, daß man, wenn man durch die Röhre *a* atmet, kein Hindernis wahrnimmt und gar nicht merkt, daß man durch ein Klappensystem atmet.

Während des Versuchs verschließt man die Nasenlöcher vermittels einer Nasenklammer. Mit den drei Röhren *e, e, e* vereinigt man durch Gummistückchen drei 25 cm lange U-förmige Röhren, die mit gekörntem Calciumchlorid gefüllt sind. Diese Röhren werden vermittels eines Schaltstückes mit 3 Wegen mit einem starken Gummischlauch vereinigt, der die Luft zu einem Verdinschen Spirometer führt. Der größeren Leichtigkeit des Wiegens halber wollte ich lieber drei Röhren mit Calciumchlorid von kleinen Dimensionen als eine einzige starke Röhre verwenden. Man muß Sorge dafür tragen, daß der Gesamtquerschnitt der drei Röhren *e, e, e* und der Röhren mit Calciumchlorid nicht geringer ist als der Querschnitt der Röhre *a*, welch letzterer Querschnitt bei meinem Apparat 1,57 qcm beträgt, der genügt, damit das Atmen ohne allzu großen Widerstand und ohne Anstrengung vor sich gehen kann. Die Röhren mit Calciumchlorid wurden vor und nach jedem Experiment gewogen.

Wenn diese Röhren in geeigneter Weise gefüllt sind, genügen sie, um das ganze Wasser der durch sie ziehenden Luft zurückzuhalten. Ich hielt es für zweckdienlich dies zu konstatieren, indem ich einige Be-

stimmungen ausführte, nachdem ich eine zweite Reihe von Röhren mit Calciumchlorid eingeschaltet hatte. In den letzteren trat keine Gewichtszunahme ein.

Mit dieser Vorrichtung konnte ich also gleichzeitig die Menge der ausgeatmeten Luft (in Litern) und die Menge des in dieser Luft enthaltenen Wassers (in Gramm) bestimmen. Auf diese Weise fand ich die Menge des in einem Liter ausgeatmeter Luft enthaltenen Wassers und nahm diese Menge zur Grundlage aller meiner Untersuchungen.

Im allgemeinen wurden bei jedem Versuch 40 Respirationen gemacht, wobei die für diese 40 Respirationen erforderliche Zeit berücksichtigt wurde.

Ich beobachtete auch die Temperatur der Umgebung und die Menge des Wassers in der eingeatmeten Luft. Zu diesem Zwecke leitete ich vermittels eines Gasometers von bekannter Kapazität (ca. 25 l) Luft durch eine Röhre mit Calciumchlorid und wog die Röhre vor und nach dem Durchgang der Luft.

I. Menge des in 1 l ausgeatmeter Luft enthaltenen Wassers bei verschiedenen Personen und bei verschiedenen Umgebungstemperaturen.

Diese Versuche wurden mit 7 Personen gemacht und in verschiedenen Zeitabschnitten, in denen die Temperatur der Umgebung ca. 12°, 15° bis 16°, 24° bis 25° betrug.

Tabelle I.

Umgebungstemperatur ca. 12°. Kältegefühl.

Datum	Versuchsperson	Temperatur d. Umgebung Grad	Zeit, die erforderlich war, um 40 Respirationen zu machen	Wassergehalt eines Liters Luft der Umgebung	Wassergehalt eines Liters ausgeatmeter Luft
3. III. 10^h v.	Cicconardi, Gaet.	12,5	3′ 35″	0,0035	0,0329
4. 9^h v.	„	12,5	3′ 50″	0,0034	0,0327
7. 10^h v.	„	12,5	3′ 50″	0,0040	0,0328
9. 10^h v.	„	12,0	4′ 00″	0,0039	0,0328
3. II. 9^h v.	Galeotti, Gino	12,0	4′ 00″	0,0048	0,0324
6. 9^h v.	„	12,0	4′ 00″	0,0050	0,0327
11. 8^h v.	„	12,5	4′ 00″	0,0075	0,0322
12. 8^h v.	„	12,5	4′ 00″	0,0055	0,0322
17. 9^h v.	„	13,0	4′ 00″	0,0060	0,0329
3. III. 10^h v.	„	12,5	4′ 00″	0,0035	0,0325
4. 9^h v.	„	12,5	4′ 00″	0,0034	0,0325

Tabelle II.

Umgebungstemperatur 15° bis 16°.

Datum	Versuchsperson	Temperatur d. Umgebung Grad	Zeit, die erforderlich war, um 40 Respirationen zu machen	Wassergehalt eines Liters Luft der Umgebung	Wassergehalt eines Liters ausgeatmeter Luft
26. III. 5h n.	Galeotti, Gino	14,5	4′ 00″	0,00593	0,0340
11. 10h v.	"	15,0	4′ 00″	0,00742	0,0339
12. 3h n.	"	15,0	4′ 00″	0,00551	0,0344
31. 3h n.	"	15,0	4′ 00″	0,00607	0,0345
2. IV. 10h v.	"	15,0	4′ 00″	0,00618	0,0340
28. III. 10h v.	Cicconardi, Gaet.	15,5	2′ 50″	0,00607	0,0344
29. 10h v.	"	16,0	2′ 45″	0,00637	0,0343
29. 4h n.	"	16,0	2′ 35″	0,00637	0,0343
30. 10h v.	"	16,0	2′ 55″	0,00687	0,0347
30. 2h n.	"	16,0	3′ 00″	0,00687	0,0343
2. IV. 10h v.	"	16,0	3′ 00″	0,00618	0,0343
28. III. 10h v.	Cicconardi, Gius.	15,5	2′ 30″	0,00607	0,0330
29. 10h v.	"	16,0	2′ 30″	0,00637	0,0335
29. 4h n.	"	16,0	2′ 30″	0,00637	0,0344
30. 10h v.	"	16,0	2′ 55″	0,00687	0,0325
30. 2h n.	"	16,0	3′ 10″	0,00687	0,0328
28. 10h v.	Pentimalli, Franc.	15,5	3′ 10″	0,00607	0,0341
28. 3h n.	"	15,5	3′ 10″	0,00607	0,0338
29. 10h v.	"	16,0	3′ 20″	0,00637	0,0359
29. 4h n.	"	16,0	3′ 30″	0,00637	0,0338
29. 4h n.	"	16,0	3′ 10″	0,00637	0,0352
30. 10h v.	"	16,0	3′ 50″	0,00687	0,0353
1. IV. 10h v.	Lettieri	16,0	3′ 30″	0,00720	0,0341
29. 9h v.	"	16,0	3′ 35″	0,00870	0,0344
2. V. 10h v.	"	16,0	3′ 30″	0,00836	0,0337
3. 10h v.	"	16,0	3′ 30″	0,00644	0,0346
1. IV. 10h v.	Torraca, Luigi	16,0	2′ 20″	0,00720	0,0328
9. 10h v.	"	16,0	3′ 20″	—	0,0339
11. 10h v.	"	15,0	3′ 40″	0,00643	0,0352
13. 10h v.	"	15,0	4′ 20″	—	0,0350
16. 9h v.	"	14,5	3′ 50″	0,00676	0,0324
23. 10h v.	"	15,0	3′ 40″	0,00557	0,0353
11. 10h v.	Signorelli, Ern.	15,0	3′ 10″	0,00643	0,0352
16. 10h v.	"	14,5	3′ 00″	0,00676	0,0347
23. 10h v.	"	15,0	3′ 10″	0,00557	0,0353
2. V. 10h v.	"	16,0	3′ 20″	0,00836	0,0370
3. 10h v.	"	16,0	3′ 30″	0,00644	0,0365

Tabelle III.

Umgebungstemperatur 23° bis 25°.

Datum		Versuchsperson	Temperatur d. Umgebung Grad	Zeit, die erforderlich war, um 40 Respirationen zu machen	Wassergehalt eines Liters Luft der Umgebung	Wassergehalt eines Liters ausgeatmeter Luft
17. VI.	10h v.	Galeotti, Gino	23,0	4′ 00″	0,0124	0,0361
17.	3h n.	„	23,5	4′ 00″	0,0124	0,0360
19.	4h n.	„	25,0	3′ 30″	0,0104	0,0360
21.	4h n.	„	24,0	3′ 35″	—	0,0356
23.	11h v.	Cicconardi, Gaet.	23,0	4′ 10″	0,0124	0,0363
23.	3h n.	„	23,5	4′ 15″	0,0124	0,0369
25.	3h n.	„	24,0	4′ 50″	—	0,0365
25.	4h n.	„	24,0	4′ 00″	—	0,0368
17.	3h n.	Signorelli, Ern.	23,5	3′ 35″	0,0124	0,0357
19.	4h n.	„	25,0	3′ 40″	0,0104	0,0360
21.	4h n.	„	24,0	3′ 20″	—	0,0365
24.	3h n.	„	25,0	3′ 30″	0,0108	0,0384
17.	3h n.	Lettieri	23,5	2′ 20″	0,0124	0,0369
27.	3h n.	„	25,0	3′ 00″	0,0111	0,0403
28.	3h n.	„	25,0	2′ 40″	—	0,0389
19.	4h n.	Torraca, Luigi	25,0	3′ 50″	0,0104	0,0367
27.	5h n.	„	25,0	3′ 40″	0,0111	0,0364
11. VII.	9h v.	„	25,0	3′ 40″	—	0,0360
23. VI.	3h n.	Pentimalli, Franc.	2[illegible],0	3′ 00″	0,0108	0,0354
17. VII.	4h n.	„	26,0	—	—	0,0350
18.	3h n.	„	26,0	—	—	0,0359
19.	11h v.	„	26,0	—	—	0,0368
6.	2h n.	Cicconardi, Gius.	25,0	3′ 40″	—	0,0400
7.	6h n.	„	25,0	4′ 25″	—	0,0363

Nehmen wir die Mittel der obenerwähnten Versuche, die sehr übereinstimmende Resultate ergeben haben, so erhalten wir für die verschiedenen Versuchspersonen:

Versuchspersonen	Umgebungstemperatur 12°	14° bis 15°	23° bis 25°
Galeotti, Gino	0,0325	0,0342	0,0359
Cicconardi, Gaetano	0,0328	0,0344	0,0366
Signorelli, Ernesto	—	0,0357	0,0366
Lettieri	—	0,0342	0,0387
Torraca, Luigi	—	0,0341	0,0364
Pentimalli, Francesco	—	0,0345	0,0358
Cicconardi, Giuseppe	—	0,0334	0,0381

Aus diesen Versuchen ersieht man schon, daß die verschiedenen Personen unter denselben Bedingungen ungefähr gleiche Mengen Wasserdampf ausscheiden. Diese Menge, die

ich normal nennen will, läßt sich bei der mittleren Umgebungstemperatur von 15° auf

0,0342 g pro Liter Luft

festsetzen.

Bei niedrigeren Temperaturen, wenn man die Empfindung der Kälte hat, ist diese Menge geringer, bei höheren Temperaturen dagegen größer.

Es ist jedoch immer ein beträchtlicher Unterschied vorhanden im Vergleich zur Wassermenge, die sich in der mit Wasser gesättigten Luft bei der Körpertemperatur vorfindet, da diese, wie sich aus den im Jahre 1875 für die italienische Meteorologie veröffentlichten Tabellen ergibt,

0,0436 g pro Liter Luft

beträgt.

Mithin kann man sagen, daß der hygrometrische Grad der ausgeatmeten Luft, den ich mit i bezeichnen will,

$$i = \frac{0{,}0342}{0{,}0436} \times 100 = 78{,}4$$

ist.

Zu bemerken ist, daß der nicht gering zu schätzende Unterschied zwischen den Mengen des ausgeatmeten Wassers, wenn die Umgebungstemperatur 12° ist, und der bei einer Umgebungstemperatur von 15° bis 16° ausgeatmeten Menge von dem allgemeinen Kältegefühl abhängt, das oft bei der Temperatur von 12° eintritt, und nicht von direkten Einflüssen, die das Einatmen einer etwas wärmeren oder etwas kälteren Luft als 3 oder 4° ausübt.

Dies ergibt sich klar aus den folgenden Zahlen, die ich bei an mir selbst angestellten Versuchen entnommen habe:

Tabelle IV.

	Mit 1 l Luft ausgeatmetes Wasser
Umgebungstemperatur 12°. Kältegefühl	0,0326
Id. Nach Vornahme einiger Turnübungen und Trinken von warmem Tee	0,0339
Umgebungstemperatur 12°. Kältegefühl	0,0328
Id. Als ich nach den Turnübungen geschwitzt hatte	0,0340

Tabelle IV (Fortsetzung).

	Mit 1 l Luft ausgeatmetes Wasser
Umgebungstemperatur 16°. Ich ziehe die Kleider aus, bis mir kalt wird	0,0333
Id. Ich mache einige Turnübungen, bis mir warm wird	0,0339
Umgebungstemperatur 12°. Kältegefühl	0,0325
Id. Ich atme auf 20° erwärmte Luft ein	0,0325
Umgebungstemperatur 12°. Kältegefühl	0,0326
Id. Ich atme auf 20° erwärmte Luft ein	0,0325

Aus diesen und anderen ähnlichen Versuchen, die genau die gleichen Resultate ergaben, weshalb ich sie der Kürze halber nicht beschreibe, ergibt sich:

Wenn man das Gefühl der Kälte hat, nimmt die Menge des ausgeatmeten Wassers ab, und zwar sowohl wenn man kalte Luft einatmet als auch bei Einatmung von mäßig warmer Luft; wird der Körper erwärmt, so nimmt die Menge des ausgeatmeten Wassers zu, wenn auch die Temperatur der umgebenden Luft ziemlich niedrig bleibt.

Mit anderen Worten, man kann sagen, daß leichte Unterschiede in der Temperatur der eingeatmeten Luft keine Veränderungen der Menge des durch die Lungen abgegebenen Wasserdampfes verursachen; wenn aber die Temperatur der Umgebung so weit sinkt, daß ein Kältegefühl eintritt, so nimmt die Menge des ausgeatmeten Wasserdampfes ab.

II. Unterschiede in der Menge des pro Liter Luft ausgeatmeten Wassers, die durch den Atmungsrhythmus bedingt sind.

Aus den Tabellen I, II und III ist zu ersehen, daß, wenn der Atmungsrhythmus zwischen 10 und 16 Respirationen pro Minute schwankt, keine bemerkenswerten Veränderungen der Menge des ausgeatmeten Wassers eintreten. Es ist jedoch zu bemerken, daß unter den auf S. 177 angeführten Mitteln das kleinste das von Giuseppe Cicconardi (0,0334 g) ist, dessen Atmungsrhytmus bei den Versuchen bei der Temperatur 15° bis 16° etwas häufiger war. Auch aus anderen Bestimmungen hat sich mir ergeben, daß Personen mit einem leichten Grad von Polypnoe Luft ausatmen, die eine geringere Wassermenge enthält.

Um diese Erscheinungen deutlicher nachzuweisen, führte ich an mir selbst einige Versuche aus, bei denen ich das pro Liter Luft ausgeatmete Wasser bestimmte und den Atmungsrhythmus willkürlich verlangsamte oder beschleunigte.

Die Resultate dieser Bestimmungen finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle V.

Zahl der Respirationen in der Minute	Menge des in 1 l ausgeatmeter Luft enthaltenen Wassers
10	0,0344
6	0,0350
10	0,0345
6	0,0350
10	0,0340
6	0,0356
6	0,0350
25	0,0323
6	0,0359
25	0,0337
6	0,0347
25	0,0325

Aus diesen Versuchen ersieht man, daß, wenn man den Atmungsrhythmus ungefähr um die Hälfte verlangsamt, die Menge des mit 1 l Luft ausgeatmeten Wassers um ca. 2,5 °/₀ im Vergleich zu der bei normalem Rhythmus ausgeatmeten zunimmt. Beschleunigt man den Rhythmus bis auf beinahe das Vierfache, so nimmt die Menge des ausgeatmeten Wassers ungefähr um 6,5 °/₀ ab.

Dies ist leicht zu erklären, wenn man daran denkt, daß bei langsamem Rhythmus die Luft, da sie in den Lungenalveolen bleibt, Zeit hat, sich mit Wasser zu beladen, während sie bei Zunahme der Lungenventilation weniger reich an Wasserdampf aus den Lungen austritt.

Es ist jedoch zu bemerken, daß auch bei dem sehr langsamen Rhythmus von sechs Respirationen in der Minute die in der ausgeatmeten Luft enthaltene Wassermenge sehr weit von der Menge entfernt bleibt, die die Sättigung bei 37° darstellt. Mit dem Rhythmus von sechs Respirationen erhielt ich nämlich die Maximalzahl von 0,0359 g pro Liter Luft, während sich bei der Sättigung bei 37°, wie wir sahen, die Zahl 0,0435 ergibt.

III. Änderungen der mit 1 l Luft ausgeatmeten Wassermenge, die durch die Temperatur und die Feuchtigkeit der eingeatmeten Luft bedingt sind.

Ich machte die im folgenden beschriebenen Versuche an mir selbst. Die experimentelle Technik war sehr einfach; sie bestand darin, daß ich in das Aspirationsrohr *b* (Fig. 1) Luft gelangen ließ, deren Temperatur und Feuchtigkeit modifiziert war. Um trockene Luft zu atmen, verband ich das Rohr *b* mit einer starken Glasröhre, die 50 cm lang und mit großen Stücken Calciumchlorid gefüllt war. Um warme Luft zu atmen, leitete ich diese in eine durch eine Flamme erwärmte lange

Tabelle VI.

Änderungen, die durch die Temperatur und die Feuchtigkeit der eingeatmeten Luft bedingt sind.

Temperatur der eingeatmeten Luft Grad	Feuchtigkeit der eingeatmeten Luft (H_2O pro Liter Luft) g	Menge des mit 1 l Luft ausgeatmeten Wassers g	Unterschiede
	Trockene oder feuchte Luft.		
16	0	0,0317	0,0020
16	0,00987	0,0337	
16	0	0,0335	0,0010
16	0,00963	0,0345	
16	0	0,0322	0,0019
16	0,01125	0,0341	
16	0	0,0328	0,0019
16	0,01072	0,0346	
	Laue oder warme Luft von mittlerer Feuchtigkeit.		
16	0,00574	0,0312	0,0056
40	0,00574	0,0368	
15,5	0,00545	0,0343	0,0045
50	0,00545	0,0388	
16	0,00500	0,0347	0,0058
50	0,00500	0,0405	
	Laue oder warme trockene Luft.		
15	0	0,0310	0,0026
50	0	0,0336	
16	0	0,0308	0,0030
45	0	0,0338	
16,5	0	0,0332	0,0021
50	0	0,0353	
	Trockene oder feuchte Luft.		
50	0	0,0360	0,0170
50	mit Wasserdampf gesättigte Luft	0,0530	

Röhre. Ein in der Nähe von *b* passend angebrachtes Thermometer zeigte die Temperatur der in den Klappenapparat eintretenden Luft. Um trockene warme Luft zu atmen, leitete ich die Luft zuerst in die Röhre mit Calciumchlorid und dann in die obenerwähnte Röhre zum Erwärmen. Um mit Feuchtigkeit gesättigte Luft zu atmen, verwendete ich eine lange Röhre, die durchtränkte Zeugstückchen enthielt. Diese Röhre hielt ich in ein Bad von erwärmtem Wasser, wenn ich warme, mit Dampf gesättigte Luft einatmen wollte. Bei allen diesen Versuchen hielt ich einen Atmungsrhythmus von 10 Respirationen in der Minute ein.

Aus diesen Versuchen ergibt sich:

Die Menge des mit 1 l Luft ausgeatmeten Wassers nimmt etwas (um 0,0010 bis 0,0020 g pro Liter) ab, wenn die eingeatmete Luft vollständig trocken ist;

diese Menge nimmt beträchtlich (0,0045 bis 0,0058 g) zu, wenn die eingeatmete Luft eine Temperatur von 40° bis 50° hat.

Hier muß ich jedoch wiederholen, daß nur dann ein Einfluß auf die Menge des durch die Lungen abgegebenen Wassers wahrzunehmen ist, wenn die eingeatmete Luft so warm ist; wenn dagegen, wie ich auf S. 178 bemerkte, die Änderungen der Umgebungstemperatur um wenige Grad über der mittleren normalen Temperatur schwanken, ändert sich der Wassergehalt in der ausgeatmeten Luft nicht.

Bei anderen Experimenten, die ich der Kürze halber nicht beschreibe, änderte ich die Vorrichtung so, daß ich direkt Luft zu den Lungen gelangen ließ, die infolge ihres Durchganges durch ein in Eis liegendes Rohr abgekühlt war. In diesem Falle zeigten sich keine Änderungen der Menge des mit 1 l Luft ausgeatmeten Wassers.

Eine weitere Reihe von interessanten Versuchen wurde folgendermaßen ausgeführt: Ich atmete zuerst 4 oder 5 Minuten lang auf 50° bis 70° erwärmte Luft ein, ohne eine Bestimmung des ausgeatmeten Wassers zu machen; hierauf entfernte ich rasch den Erwärmungsapparat von dem Rohre *b* (Fig. 1), brachte die Röhren mit Calciumchlorid an ihre gewöhnlichen Stellen und bestimmte das ausgeatmete Wasser, während die Versuchsperson wieder hinsichtlich der Temperatur und Feuchtigkeit normale Luft einatmete.

Tabelle VII.

Versuchsperson	Experimentelle Bedingungen	Temperatur d. eingeatmet. Luft Grad	Feuchtigkeit d. eingeatmet. Luft g	Menge des in 1 l ausgeatm. Luft enthaltenen Wassers g
Galeotti, Gino	Unter normalen Bedingungen	17,0	0,00720	0,0345
	Nachdem 4 Minuten lang Luft bei 50° eingeatmet worden war	17,0	0,00720	0,0352
"	Unter normalen Bedingungen	16,5	0,00618	0,0347
	Nachdem 4 Minuten lang Luft bei 90° eingeatmet worden war	16,5	0,00618	0,0357
Cicconardi, Gaetano	Unter normalen Bedingungen	16,5	0,00720	0,0347
	Nachdem 4 Minuten lang Luft bei 65° eingeatmet worden war	16,5	0,00720	0,0379
"	Unter normalen Bedingungen	16,5	0,00618	0,0343
	Nachdem 5 Minuten lang Luft bei 70° eingeatmet worden war	16,5	0,00618	0,0374
"	Unter normalen Bedingungen	15,5	0,00350	0,0339
	Nachdem 5 Minuten lang Luft bei 70° eingeatmet worden war	15,5	0,00350	0,0389
"	Unter normalen Bedingungen	14,0	0,00340	0,0337
	Nachdem 5 Minuten lang Luft bei 70° eingeatmet worden war	14,0	0,00340	0,0378

Aus diesen Versuchen ersieht man also, daß das Einatmen von warmer Luft gewisse Modifikationen im Zustande der Lungen herbeiführt, so daß eine größere Lungenverdünstung eintritt, und daß diese Modifikationen wenigstens einige Minuten lang fortdauern, nachdem man wieder hinsichtlich der Temperatur und Feuchtigkeit normale Luft einatmet.

Schlußfolgerungen.

1. Die ausgeatmete Luft ist nicht mit Wasser gesättigt. Sie enthält eine Wassermenge, die unter normalen Bedingungen des Organismus 0,0342 g pro Liter Luft entspricht, während mit Wasser gesättigte Luft bei der Temperatur 37° (dies ist wahrscheinlich die Temperatur der aus den Luftwegen tretenden Luft) 0,0436 g enthält. Der Feuchtigkeitsgrad der ausgeatmeten Luft ist also nicht 100, sondern ungefähr 78.

2. Der Atmungsrhythmus übt einen gewissen Einfluß auf den Wassergehalt der ausgeatmeten Luft aus: Wird der Rhythmus beschleunigt, so ist die ausgeatmete Luft weniger mit Wasser beladen; wird er verlangsamt, so ist der Wassergehalt größer, ohne daß es jedoch jemals zur Sättigung kommt.

3. Die Temperatur und die Feuchtigkeit der umgebenden Luft üben einen gewissen Einfluß auf die ausgeatmete Wassermenge aus, jedoch nur, wenn es sich um Änderung dieser beiden Eigenschaften über gewisse Grenzen hinaus handelt. Man kann sagen, daß der Wassergehalt der ausgeatmeten Luft sich nicht ändert, wenn die Temperatur der letzteren nur zwischen 0° und 20° variiert. Desgleichen, wenn die Feuchtigkeit der Luft 0,003 bis 0,008 g Wasser pro Liter entspricht. Wird jedoch sehr warme Luft (von 40° bis 50°) eingeatmet, so nimmt der Wassergehalt der ausgeatmeten Luft beträchtlich (bis zu 16%) zu, was auch der Fall ist, wenn sehr feuchte Luft eingeatmet wird. Ist aber die eingeatmete Luft vollständig trocken, so nimmt der Wassergehalt in der ausgeatmeten Luft etwas (3 bis 6%) ab.

4. Atmet man eine gewisse Zeit hindurch (4 oder 5 Minuten) sehr warme Luft (von 50° bis 70°) ein und dann wieder Luft von normaler Temperatur, so dauert der Überschuß von Wasserausscheidung durch die Lungenwege fort.

5. Aus den in den Tabellen I und III zusammengestellten experimentellen Daten ersieht man, daß, wenn Kältegefühl eintritt, die Wasserausscheidung durch die Lungen abnimmt, während beim Wärmegefühl diese Ausscheidung zunimmt.

6. Diese letzten Resultate lassen daran denken, daß die mit der ausgeatmeten Luft ausgeschiedene Wassermenge von dem Zustande der Lungengefäße abhängt. Wahrscheinlich tritt

während des Einatmens sehr warmer Luft eine Gefäßerweiterung in den Lungen ein und infolgedessen größere Wasserverdünstung durch das Epithel der Atemwege, und diese Gefäßerweiterung und die größere Wasserausscheidung dauern eine Zeitlang fort, auch nachdem die Einführung von warmer Luft in die Lungen aufgehört hat.

Durch vasomotorische Veränderungen muß auch die Abnahme der Menge des ausgeatmeten Wassers bedingt sein, wenn Kältegefühl vorhanden ist, und die Zunahme, wenn das Gefühl der Wärme eintritt. Man könnte deshalb eine vasomotorische Übereinstimmung zwischen der Haut und den Lungen annehmen, in dem Sinne, daß, wenn Gefäßzusammenziehung in der Haut vorhanden ist und wenn die Hautcapillaren sich erweitern, sich auch die Lungencapillaren erweitern.

Diese vasodilatatorischen Veränderungen in den Lungen infolge von Wärme- oder Kälteempfindung und die hierauf eintretenden Veränderungen der Verdunstung in den Lungen, die, wie es scheint, dadurch entstehen, könnten als ein atavistisches funktionelles Überbleibsel des Mechanismus der Wärmeregulierung durch die Atmung, der so wichtig bei den nicht schwitzenden Säugern und bei den niederen Wirbeltieren ist, erklärt werden.

Da diese ersten Versuche die Unrichtigkeit der Vorstellung beweisen, daß die ausgeatmete Luft mit Wasser gesättigt sei, und da sie zeigen, daß die mit 1 l Luft ausgeschiedene Wassermenge unter mittleren normalen Bedingungen eine beinahe konstante ist, so ebnen sie den Weg für viele Untersuchungen über diesen auch wichtigen Teil der Lungenfunktion unter pathologischen Bedingungen, unter dem Einfluß von Medikamenten oder Stoffen, die den funktionellen Zustand der Lunge ändern — namentlich im Hinblick auf die vasomotorischen Leistungen in diesen Organen.

Derartige Untersuchungen beabsichtige ich demnächst anzustellen.

Blut- und Harnzucker bei kontinuierlicher Adrenalininfusion[1]).

Von

M. Gramenitzki (St. Petersburg).

(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 6. Oktober 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Die quantitativen Wechselbeziehungen zwischen der Dosis des in das Blut eingeführten Adrenalins und dem Grade der

---

[1]) Bemerkung zur folgenden Arbeit, von W. Straub:

Von kollegialer Seite sind mir Zweifel an der Richtigkeit der Resultate der unter meiner Leitung gemachten Untersuchung Ritzmanns über den Mechanismus der Adrenalinglucosurie geäußert worden. Die Nachprüfung habe die Proportionalität von Reizgröße und Effekt nicht bestätigt. Von P. Underhill ist außerdem auf die Urethannarkose als Fehlerquelle in überzeugender Weise hingewiesen worden. Ich möchte mir die persönliche Bemerkung erlauben, daß ich an der Ausführung der Versuche Ritzmanns sehr eingehend beteiligt war und die Überzeugung der durchaus zuverlässigen Arbeitsweise Ritzmanns gewonnen habe. Die Ritzmannsche Untersuchung entstand in kurzem Zeitraume, da alle Versuche glatt und widerspruchslos verliefen. Möglicherweise haben sich dabei, ohne unsere Kenntnis, temporäre Besonderheiten, Saisoneinflüsse, Rasseneigentümlichkeiten der Tiere im günstigen Sinne geltend gemacht. Ich möchte an diese als Erklärung sonst fatale Möglichkeit des Hereinspielens unbekannter Faktoren um so eher glauben, als sich die Feststellung Ritzmanns vom hemmenden Einfluß der Schilddrüsenexstirpation auf die Adrenalinglucosurie und Blutdruckwirkung in der Folge im hiesigen Laboratorium nie mehr bestätigen ließ. Wir haben die Versuche seither jedes Jahr und zu verschiedenen Jahreszeiten wiederholt, aber niemals die an sich klaren und eindeutigen Befunde Ritzmanns wiederbekommen können. Wenn m. E. auch kein Zweifel an der Richtigkeit der damaligen Feststellung besteht, so kann sie doch nicht als gesetzmäßig verallgemeinert werden. Da Ritzmann inzwischen verstorben und seine Aufzeichnungen mir unzugänglich sind, ist eine kritische abermalige Durcharbeitung seiner Versuche nicht mehr möglich. Ich habe deshalb Herrn Dr. M. Gramentzki gebeten, unter experimentell-kritischer Berücksichtigung aller Fehlerquellen die Ritzmannsche Untersuchung hinsichtlich des Mechanismus der Adrenalinglucosurie nachzuprüfen und insbesondere auf das Verhalten des Blutzuckers zu erweitern.

Glucosurie sind in der Arbeit von Ritzmann[1]) [vgl. auch Straub[2])] festgestellt. Dieser Autor hat nachgewiesen, daß zwischen diesen Größen in gewissen Grenzen eine direkte Proportionalität besteht, und daß der Organismus auf die verschiedenen Geschwindigkeiten der Einführung ein und derselben Giftkonzentration mit proportionalen Graden von Glucosurie reagiert, während bei sehr geringer Einführungsgeschwindigkeit Glucosurie überhaupt nicht zustande kommt, auch wenn die applizierten absoluten Adrenalinmengen beträchtlich sind. Wir haben es hier also mit Wechselbeziehungen zu tun, die mit denjenigen vollkommen identisch sind, die von Kretschmer[3]) für die Wirkung des Adrenalins auf den Blutdruck festgestellt sind.

Meine auf Anregung von Prof. Straub ausgeführten Untersuchungen sind teilweise eine Nachprüfung der Experimente von Ritzmann, sollen aber auch die Ritzmannsche Untersuchung ergänzen und erweitern, indem die Glucosurie gleichzeitig mit der Hyperglykämie gemessen wurde. Da in Sachen der Adrenalinglucosurie in der Literatur nicht völlige Übereinstimmung herrscht, habe ich es mir besonders angelegen sein lassen, alle Bedingungen des einschlägigen Versuchs auch hinsichtlich der Fehlerquellen kritisch zu prüfen.

Methodik.

Die Experimente wurden fast ausschließlich an Kaninchen, und nur wenige an Katzen angestellt. Es wurde, von Spezialfällen abgesehen, stets ein frisches, gut genährtes Tier genommen, an dem noch keine Experimente angestellt worden waren, und das auf gemischter Kost (Rüben und Hafer) gehalten wurde. Bisweilen wurden hungernde oder durch Einführung von Rohrzucker in den Magen künstlich auf Glucosurie sensibilisierte Tiere verwendet.

Eine Verbesserung der Untersuchungsmethodik im Vergleich zu derjenigen von Ritzmann bestand darin, daß ich den Straubschen Infusionsapparat verwendete (Münch. med. Wochenschr. **1911**), der die Möglichkeit gewährt, die Schnelligkeit der Einführung in sehr breiten Grenzen und unabhängig von den Druckschwankungen im Venensystem des Tieres mit voller Genauigkeit zu regulieren. Bei der Bestimmung des Blutzuckers richtete ich mich im allgemeinen nach den in der Arbeit von Moeckel und Frank[4]) gemachten Angaben. Diese Methode, die das

[1]) Ritzmann, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **1909**.
[2]) Straub, Münch. med. Wochenschr. **1909**.
[3]) Kretschmer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **1907**.
[4]) Moeckel und Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 1910.

Arbeiten mit geringen Blutmengen (für jede einzelne Bestimmung verwendete ich gewöhnlich 3 bis 4 g) ermöglicht, verdient besonders vorgezogen zu werden. Die eigentliche Zuckerbestimmung wurde nach der Reduktionsmethode von Bang ausgeführt, wobei ich statt der Titrierung mit Hydroxylamin die colorimetrische Methode (Colorimeter von Autenrieth) verwendete. Bei der Bestimmung derjenigen Zuckermengen, mit denen ich gewöhnlich zu tun hatte (3 bis 7 mg in einem bestimmten Volumen des Filtrates) gibt diese Methode vollkommen befriedigende Resultate. Ich verwendete dieselbe auch zur quantitativen Bestimmung des Zuckers im Harn. Die qualitativen Analysen wurden mit Fehlingscher Flüssigkeit vorgenommen.

Das Blut wurde der Carotis entnommen. Zur Aufzeichnung des Blutdruckes (Quecksilbermanometer) wurde eine der Carotiden gewählt. Die Kanüle für die Einführung des Giftes wurde mit der V. jugularis in Verbindung gebracht. Als Adrenalinpräparat verwendete ich für meine Experimente das l-Suprareninum syntheticum Höchst, da Versuche mit genuinem Nebennierensafte gleichsinnig mit denen mit dem synthetischem Alkaloid ausfielen. Als Lösungsmittel wurde die mit Salzsäure ganz schwach angesäuerte Ringersche Flüssigkeit verwendet.

I. Experimente an narkotisierten Tieren.

a) Reine Nachprüfung der Ritzmannschen Untersuchung.

Versuch 1.

Kaninchen ♂, 1500 g Körpergewicht. 1,25 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. Die Harnblase wurde geöffnet und einer der Ureteren katheterisiert. Harn zuckerfrei. NN. vagi am Halse durchgeschnitten.

Zeit	Infusion	Blutdruck	Harn
$5^h\,2'$	Ringersche Lösung, während 3 Min. 12 ccm	Von 90 mm (norm.) bis 90 mm	Zuckerfrei
$6^h\,6'$	Adrenalin 1:20000000, während 3 Min. 15 ccm resp. 5 ccm pro Min. = $2,5 \times 10^{-7}$ g pro Min.	Von 100 mm (norm.) bis 98 mm	$6^h\,6'$ bis $6^h\,21'$ zuckerfrei
$6^h\,21'$	Adrenalin 1:10000000, während 5 Min. 36 ccm resp. 7,25 ccm pro Min. = $7,5 \times 10^{-7}$ g pro Min.	Von 92 mm (norm.) bis 108 mm	$6^h\,21'$ bis $6^h\,31'$ zuckerfrei $6^h\,31'$ Zucker in Spuren $6^h\,39'$ reichlich Zucker $6^h\,43'$ " " $6^h\,45'$ wenig Zucker $6^h\,49'$ bis $7^h\,1'$ zuckerfrei
$7^h\,1'$	Adrenalin 1:10000000, während 5 Min. 33 ccm resp. 6,6 ccm pro Min. = $6,6 \times 10^{-7}$ g pro Min.	Von 90 mm (norm.) bis 100 mm	$7^h\,1'$ bis $7^h\,6'$ zuckerfrei $7^h\,6'$ " $7^h\,11'$ 2 mg Zucker $7^h\,11'$ " $7^h\,16'$ 2 " " $7^h\,16'$ " $7^h\,21'$ 2 " " $7^h\,21'$ " $7^h\,26'$ Zucker in Spuren

Versuch abgebrochen.

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß es tatsächlich eine als Glucosurie reizunterschwellige Adrenalinkonzentration im Blute gibt, sowie daß die auf einen wirksamen Adrenalinreiz hin verursachte Glucosurie von vorübergehender Dauer ist, durch eine Adrenalingabe aber wieder erzeugt werden kann. Wie ersichtlich, beginnt die Glucosurie mit merklicher Latenz nach dem Reiz durch das Adrenalin.

Kontrollversuche.

Versuch 2.

Kaninchen ♂, 2200 g Körpergewicht. 1,25 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. NN. vagi durchgeschnitten. Wegen eingetretener Dyspnoe wurde 1 mg Atropinum sulfuricum injiziert. Katheterisation der Harnblase.

Zeit	Infusion	Blutdruck	Harn
$4^h\,43'$	Adrenalin 1:2000000, während 5 Min. 6 ccm resp. 1,2 ccm pro Min. $= 0{,}6 \times 10^{-6}$ g pro Min.	Von 92 mm (norm.) bis 90 mm	$4^h\,52'$ Zucker + $5^h\,15'$ „ —
$5^h\,17'$	Adrenalin 1:2000000, während 5 Min. 12 ccm resp. 2,4 ccm pro Min. $= 1{,}2 \times 10^{-6}$ g pro Min.	Von 90 mm (norm.) bis 90 mm	$5^h\,20'$ Zucker — $5^h\,45'$ „ + 6^h „ +

Versuch abgebrochen.

Versuch 3.

Kaninchen ♂, ca. 2000 g Körpergewicht. 1,25 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. NN. vagi durchgeschnitten. Katheterisation der Harnblase.

Zeit	Infusion	Blutdruck	Harn
$3^h\,50'$	Adrenalin 1:2000000, während 2 Min. 45 ccm resp. 22,5 ccm pro Min. $= 122{,}5 \times 10^{-7}$ g pro Min.	+ 36 mm	$3^h\,53'$ Zucker — $3^h\,56'$ „ + $3^h\,56'$ bis $4^h\,1'$ 4 mg Zucker $4^h\,6'$ „ $4^h\,17'$ Zucker —
4^h bis $4^h\,22'$	Adrenalin 1:10000000, während 5 Min. 37 ccm resp. 7,4 ccm pro Min. $= 7{,}4 \times 10^{-7}$ g pro Min.	Keine Blutdrucksteigerung	$4^h\,22'$ bis $4^h\,27'$ Zucker — $4^h\,27'$ „ $4^h\,32'$ „ + $4^h\,32'$ „ $4^h\,47'$ „ —
$4^h\,33'$	Adrenalin 1:10000000, während 4 Min. 44 ccm resp. 11 ccm pro Min. $= 11 \times 10^{-7}$ g pro Min.	+ 4 mm	$4^h\,53'$ bis $5^h\,43'$ Zucker —
$5^h\,43'$	Adrenalin 1:2000000, während 3 Min. 24 ccm resp. 8 ccm pro Min. $= 40 \times 10^{-7}$ g pro Min.	+ 12 mm	$5^h\,43'$ bis $6^h\,20'$ Zucker —

Versuch abgebrochen.

Versuch 4.

Kaninchen ♂, 1800 g Körpergewicht. 1,5 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. NN. vagi durchgeschnitten. Katherisation der Harnblase.

Zeit	Infusion	Blutdruck	Harn
4h 39′	Adrenalin 1:10000000, während 15 Min. 35 ccm resp. 2,3 ccm pro Min. = 2,3 × 10^{-7} g pro Min.	Keine Einwirkung	4h 39′ bis 5h 24′ Zucker –
			Konzentr. des Harnzuckers
5h 28′	Adrenalin 1:10000000, während 5 Min. 19 ccm resp. 3,8 ccm pro Min. = 3,8 × 10^{-7} g pro Min.	Keine Einwirkung	5h 33′ bis 5h 43′ Zucker + 5h 43′ " 5h 53′ 1 mg Zucker = 0,09% 5h 53′ bis 6h 3′ 3,3 mg Zucker = 0,11% 6h 3′ bis 6h 13′ 3,2 mg Zucker = 0,158% 6h 13′ bis 6h 27′ 4 mg Zucker = 0,066% 6h 27′ bis 6h 45′ 3,5 mg Zucker = 0,044% 7h zuckerfrei

Versuch abgebrochen.

Versuch 5.

Kaninchen ♀, ca. 2000 g Körpergewicht. 1,5 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. Katheterisation.

Zeit	Infusion	Blutdruck	Harn
3h 53′	Adrenalin 1:10000000, während 5 Min. 14,5 ccm resp. ca. 3 ccm pro Min. = 3 × 10^{-7} g pro Min.	Von 102 mm (norm.) bis 102 mm	3h 53′ bis 4h 33′ zuckerfrei
4h 33′	Adrenalin 1:10000000, während 5 Min. 20 ccm resp. 4 ccm pro Min. = 4 × 10^{-7} g pro Min.	Von 100 mm (norm.) bis 100 mm	4h 33′ bis 5h 2′ zuckerfrei
5h 2′	Adrenalin 1:10000000, während 6 Min. 27 ccm resp. 4,5 ccm pro Min. = 4,5 × 10^{-7} g pro Min.	Von 100 mm (norm.) bis 102 mm	5h 2′ bis 5h 8′ 4,5 mg Zucker 5h 8′ bis 5h 18′ 7,25 mg " 5h 18′ bis 5h 28′ 4,7 mg " 5h 28′ bis 5h 38′ Zucker in Spuren

Versuch abgebrochen.

b) Versuche mit gleichzeitiger Verfolgung der Hyperglykämie und Glucosurie unter Adrenalinwirkung.

Versuch 6.

Kaninchen ♂, 2300 g Körpergewicht. 20 Stunden vor dem Versuch wurden 20 g Rohrzucker in 25%iger Lösung in den Magen ein-

geführt. Urethan (2,3 g) in 25°/₀iger Lösung in den Magen. Kathete risation.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
3ʰ		Normal 0,17 °/₀	Die Harnblase wurde alle 20 Min. ausgespült und der Zucker bestimmt
3ʰ 22′ bis 3ʰ 32′	Adrenalin 1:10000000, während 10 Min. 53 ccm resp. 5,3 ccm pro Min. = 5,3 × 10⁻⁷ g pro Min.	Nach 10 Min. 0,22 °/₀ (nach dem Ende der Infusion) Nach 31 Min. 0,175 °/₀ „ 1 Std. 14 Min. 0,21 °/₀	Harnzuckermenge 0,065 g, letzte Portion fast zuckerfrei
4ʰ 56′ bis 5ʰ 6′	Adrenalin 1:500000, während 10 Min. 53 ccm resp. 5,3 ccm pro Min. = 106 × 10⁻⁷ g pro Min.	Nach 10 Min. 0,22 °/₀ „ 34 „ 0,22 °/₀ „ 1 Std. 16 Min. 0,23 °/₀	Harnzuckermenge 0,186 g, am nächsten Morgen Harn zuckerfrei

6ʰ 31′ Versuch abgebrochen.

Versuch 7.

Kaninchen ♀, 2530 g Körpergewicht. 1,25 g Urethan in 25°/₀iger Lösung subcutan. 3 Stunden vor dem Versuch Einführung von 150 ccm Wasser in den Magen. Katheterisation usw.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
3ʰ		Normal 0,19 °/₀	
3ʰ 45′ bis 3ʰ 53′	Adrenalin 1:10000000, während 8 Min. 50 ccm resp. 6,25 ccm pro Min. = 6,25 × 10⁻⁷ g pro Min.	Nach 10 Min. 0,2 °/₀ „ 40 „ 0,18 °/₀	3ʰ 45′ bis 4ʰ 5′ 15 ccm Harn, zuckerfrei 4ʰ 5′ bis 4ʰ 25′ 2,4 ccm Harn, zuckerfrei 4ʰ 25′ bis 4ʰ 45′ 0,8 ccm Harn, zuckerfrei
4ʰ 55′ bis 5ʰ 3′	Adrenalin 1:1000000, während 8 Min. 50 ccm resp. 6,25 ccm pro Min. = 62,5 × 10⁻⁷ g pro Min.	Nach 10 Min. 0,21 °/₀ „ 40 „ 0,18 °/₀	4ʰ 55′ bis 5ʰ 15′ 13 ccm Harn = 5 mg Zucker 5ʰ 15′ bis 5ʰ 35′ 5 ccm Harn, kein Zucker 5ʰ 35′ bis 5ʰ 55′ 2 ccm Harn, kein Zucker

6ʰ Versuch abgebrochen.

Versuch 8.

Kaninchen ♂, 2500 g Körpergewicht. Das Tier hat 2 Tage vor dem Versuch mit Wasser gehungert. 1,25 g Urethan subcutan in 25°/₀iger Lösung. 3 Stunden vor dem Versuch Einführung von 150 ccm Wasser in den Magen. Katheterisation. Diurese sehr schwach: 1 bis 2 ccm in ¹/₂ Stunde.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
3^h		Normal 0,15 %	
$3^h 20'$ bis $3^h 27'$	Ringersche Lösung, während 7 Min. 50 ccm resp. ca. 7 ccm pro Min.	Nach 10 Min. 0,13 %	$3^h 20'$ bis $3^h 46'$ ca. 0,5 ccm Harn, zuckerfrei
$3^h 46'$ bis $3^h 53'$	Adrenalin 1:10000000, während 7 Min. 50 ccm resp. ca. 7 ccm pro Min. = 7×10^{-7} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,19 %	$3^h 46'$ bis $4^h 6'$ 6 ccm Harn = 5 mg Zucker $4^h 6'$ bis $4^h 46'$ 2 ccm Zucker in Spuren
$4^h 46'$ bis $4^h 53'$	Adrenalin 1:1000000, während 7 Min. 50 ccm resp. ca. 7 ccm pro Min. = 70×10^{-7} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,225 % „ 50 „ 0,20 %	$4^h 46'$ bis $4^h 56'$ 4,5 ccm Harn = 9,5 mg Zucker $4^h 56'$ bis $5^h 15'$ 10 ccm Harn = 12,5 mg Zucker $5^h 16'$ bis $5^h 36'$ 2 ccm Harn $5^h 36'$ bis $5^h 46'$ 0,3 ccm Harn
$5^h 46'$ bis $5^h 53'$	Adrenalin 1:400000, während 7 Min. 50 ccm resp. ca. 7 ccm pro Min. = 175×10^{-7} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,21 %	$5^h 46'$ bis $5^h 6'$ 10 ccm Harn = 30 mg Zucker $6^h 6'$ bis $6^h 26'$ 9 ccm Harn = 36 mg Zucker $6^h 26'$ bis $6^h 46'$ 2 ccm Harn = 4 mg Zucker

Versuch 9.

Kaninchen ♀, ca. 2000 g Körpergewicht. 40 Stunden vor dem Versuch wurden 20 g Rohrzucker in 25 % in den Magen eingebracht, desgleichen vor $1^1/_2$ Stunden ca. 150 ccm Wasser. 1,25 g Urethan subcutan. Katheterisation usw. Harnmenge: ca. 2 ccm in der Stunde.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
$3^h 30'$		Normal 0,20 %	
$3^h 42'$ bis $3^h 50'$	Adrenalin 1:10000000, während 8 Min. 50 ccm resp. 6,25 ccm pro Min. = $6{,}25 \times 10^{-7}$ g pro Min.	Nach 35 Min. 0,225 % „ 1 Std. 20 Min. 0,21 %	$3^h 42'$ bis $4^h 12'$ 11,5 ccm Harn = 0,043 g Zucker $4^h 12'$ bis $4^h 42'$ 6,5 ccm Harn = 0,028 g Zucker $4^h 42'$ bis $5^h 12'$ 4,5 ccm Harn = 0,038 g Zucker
			Während $1^1/_2$ Std. 0,109 g Zucker
$5^h 14'$ bis $5^h 22'$	Adrenalin 1:500000, während 8 Min. 50 ccm resp. 6,25 ccm pro Min. = 124×10^{-7} g pro Min.	Nach 35 Min. 0,26 % „ 1 Std. 20 Min. 0,28 %	$5^h 14'$ bis $5^h 44'$ 9 ccm Harn = 0,081 g Zucker $5^h 44'$ bis $6^h 14'$ 1,2 ccm Harn = 0,01 g Zucker $6^h 14'$ bis $6^h 44'$ 1,2 ccm Harn = 0,012 g Zucker
			Während $1^1/_2$ Std. 0,103 g Zucker

$6^h 44'$ Versuch abgebrochen.

Das Resultat der Versuche 2 bis 9 stimmt also im wesentlichen mit dem Versuch 1 überein und zeigt, daß man mit einem gewissen, von Fall zu Fall wechselnden Schwellenwerte vorübergehend Glucosurie erzielen kann, darunterliegende Werte sind unwirksam.

Außerdem ergab sich — was bisher noch nicht untersucht worden ist, daß die Schwelle für die Glucosurie jedenfalls tiefer liegt als diejenige der Blutdrucksteigerung. Ich habe allerdings auch in manchen Versuchen ein Verschwinden der Glucosurie während der ganzen Versuchsdauer nicht beobachtet, oder es hatte schon die Narkose und die Einführung der Ringerschen Flüssigkeit (resp. einer physiol. NaCl-Lösung) allein Glucosurie zur Folge; doch sind die mitgeteilten Versuche dafür beweisend, daß im Prinzip die Ritzmannschen Resultate richtig sind. Es ist möglich, daß der Organismus unter den geschilderten Versuchsbedingungen zur Glucosurie prädisponiert ist, so daß schon sehr schwache Konzentrationen des Adrenalins genügen, um dieselbe hervorzurufen. Ob die Wirkung des Urethans auf die Nieren und die Harnabsonderung (fast immer ausgesprochene Diurese) oder die Narkose an und für sich, resp. die Herabsetzung der Oxydationsprozesse im Organismus (Glagolew[1]) hier die Hauptrolle spielten, ist schwer zu sagen.

Jedenfalls ist auf die Arbeit von Underhill[2]) hinzuweisen, der nachgewiesen hat, daß das Urethan die Kaninchen für die Adrenalinglucosurie außerordentlich empfindlich macht, so daß diese selbst bei Adrenalindosen eintritt, die auf den normalen Organismus eine glucosurische Wirkung nicht auszuüben vermögen.

Hinsichtlich der Hyperglykämie kann man sagen, daß die Proportionalität zwischen der Größe der Adrenalindosis und dem Zucker im Blut bei größeren Dosen des Giftes ersichtlich ist (Versuch 8 und 9). Bei schwächeren Dosen ist die Hyperglykämie nur gering.

---

[1]) Glagolew, Biochem. Centralbl. 2, 1904; russische Diss. 1904.
[2]) Underhill, Journ. of Biol. Chem. 9, 1911.

II. Kritische Bearbeitung der allgemeinen Versuchsbedingungen.

In den folgenden Versuchen wurden die allgemeinen Bedingungen der vorhergehenden einer kritischen Bearbeitung unterworfen. Zunächst soll auf die Underhillschen Untersuchungen hin der Einfluß des Urethans studiert werden. Es wurde eine künstliche Hyperglykämie durch Zufuhr von Traubenzucker ins Blut erzeugt und das Verhalten von Blut- und Harnzucker studiert.

A. Zuckerhaushalt bei künstlicher Zuckerzufuhr.

a) Mit Narkose.

Versuch 10.

Kaninchen ♂, 1570 g Körpergewicht. In den letzten Tagen wurde das Tier mit Rüben gefüttert. 0,75 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. Katheterisation usw.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
3^h		Normal 0,22% (!)	3^h 22′ bis 3^h 52′ 11 ccm, zuckerhaltig 3^h 52′ bis 4^h 22′ 4 ccm, zuckerhaltig Während der Nacht 30 ccm, zuckerhaltig.
3^h 22′	In die Ohrvene 0,25 g Traubenzucker in Ringer-Lösung schnell eingeführt.	Nach 1/4 Min 0,21% „ 30 Min. 0,25% „ 1 Std. 30 Min. 0,25% „ 3 Std. 0,26%	Harnzucker zusammen 1,2 g Die Glucosurie dauerte 18 Std.

Der Organismus hat somit fünfmal so viel Zucker ausgeschieden, als er bekommen hat, und die eingetretene Glucosurie hielt sehr lange an.

Versuch 11.

Kaninchen, 1500 g Körpergewicht. 0,75 g Urethan in 25%iger Lösung subcutan. Harnmenge ca. 2 ccm in der Stunde.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
2^h 50′		Normal 0,12%	
2^h 57′	Schnelle Einführung von 0,5 g Traubenzucker in Ringerscher Lösung in die Ohrvene.	Nach 2 Min. 0,20% „ 15 „ 0,18% „ 1 Std. 0,15% „ 2 „ 0,14%	15 Min. nach der Einführung ausgesprochene Diurese; Harn zuckerhaltig. Von 3^h bis 5^h 11 ccm Harn = 0,048 g Zucker. Harn in der Nacht zuckerfrei.

b) Ohne Narkose.

Versuch 12.

Kaninchen ♂, ca. 2500 g Körpergewicht. Katheterisation usw. Harnmenge sehr gering, ca. 2 ccm in der Stunde.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
12h 30′		Normal 0,17 %	
12h 35′	In die Ohrvene wurden 0,8 g Traubenzucker in Ringerscher Lösung schnell eingeführt.	Nach 2 Min. 0,28 % „ 15 „ 0,22 % „ 3 Std. 0,17 %	12h 30′ bis 5h 30′ 17 ccm Harn = 0,022 g Zucker. Harn in der Nacht zuckerfrei

Im vorliegenden Falle hat das nicht narkotisierte Tier im Vergleich zu demjenigen des vorangehenden Experiments zweimal weniger Zucker ausgeschieden und der Abfall der Glucosurie bis zur Norm war stärker ausgeprägt.

c) Ohne Narkose. Nicht gefesselte Tiere.

Versuch 13.

Kaninchen ♂, ca. 2500 g Körpergewicht.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
2h 30′		Normal 0,20 %	
2h 48′	In die Ohrvene wurden 0,8 g Traubenzucker in Ringerscher Lösung schnell eingeführt.	Nach 2 Min. 0,30 % „ 15 „ 0,22 % „ 3 Std. 0,16 %	Harn zuckerfrei.

Versuch 14.

Kaninchen ♂, ca. 1800 g Körpergewicht.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
2h 50′		Normal 0,19 %	
2h 58′	In die Ohrvene wurden 0,8 g Traubenzucker in Ringerscher Lösung eingeführt.	Nach 2 Min. 0,22 % „ 37 „ 0,19 % „ 1 Std. 30 Min. 0,19 % „ 3 „ 0,19 %	Harn zuckerfrei. Harnmenge sehr gering.

Bei nicht gefesselten Tieren fehlte also die Glucosurie vollständig, während die eingetretene Hyperglykämie rasch zur Norm zurückgekehrt war.

Es hat sich also auch hier — in Bestätigung der Angaben von Underhill — herausgestellt, daß Urethannarkose und Fesselung zur Untersuchung abnormer Zustände des Zuckerhaushalts ungeeignete Bedingungen sind.

Damit zum Teil (eine weitere Ursache liegt im Einfluß des Aderlasses an sich selbst, s. C) dürften die zahlreichen Fälle ihre Erklärung finden, in denen ich, trotz kurzen Adrenalinreizes, sehr anhaltende Glucosurie, die während des Versuchs nicht verschwand, bekam.

B. Diurese und Glucosurie.

Nachdem ich fast in allen Fällen stark ausgesprochene Diurese bei Urethannarkose beobachtete und da ich eine gute Diurese für die quantitative Verfolgung der Glucosurie brauchte, versuchte ich festzustellen, erstens, ob die diuretische Wirkung des Urethans durch den mit dieser Verbindung eingeführten Harnstoff bedingt ist, und zweitens, ob man nicht unter Vermeidung der Narkose den Harnstoff allein für die Zwecke meiner Experimente verwenden könnte.

Versuch 15.

Zwei Kaninchen: Nr. 1 1800 g, Nr. 2 1900 g Körpergewicht, Katheterisation usw.

Normale Harnmenge:	Nr. 1: 12 ccm in der Stunde „ 2: 2 „ „ „ „	
Harnmenge:	„ 1: 18 „ „ „ 1. Stunde „ 2: 12 „ „ „ 1. „	Eingeführt subcutan Nr. 1: 1 g Urethan „ 2: 0,9 g Harnstoff
	„ 1: 14 „ „ „ 2. „ „ 2: 5 „ „ „ 2. „	
	„ 1: 2 „ „ „ 3. „ „ 2: 2 „ „ „ 3. „	Harn von Kaninchen Nr. 1 zuckerhaltig, in der Nacht zuckerfrei.

Wir sehen, daß der einem Kontrollkaninchen ungefähr in derselben Quantität, wie er im Urethan enthalten ist, eingeführte Harnstoff einen sehr stark ausgeprägten diuretischen Effekt zur Folge hatte, ohne hierbei von Glusosurie begleitet zu sein. Diese letztere war samt der Steigerung der (auch ohnehin ziemlich stark ausgeprägten) Diurese die Folge der Urethaneinführung bei einem anderen Kaninchen.

Versuch 16.

Kaninchen, ca. 1500 g Körpergewicht. 20 Stunden vor dem Versuch wurden 20 g Rohrzucker in 25%iger Lösung in den Magen eingebracht.

Normale Harnmenge 3 ccm. Während ½ Stunde, zuckerfrei.

2,5 g Harnstoff pro Kilogramm in den Magen in 10%iger wässeriger Lösung eingebracht.

Harnmenge:	1. ½ Stunde	8 ccm	=	4 mg	Harnzucker
	2. ½ "	17 "	=	28 "	"
	3. ½ "	30 "	=	112 "	"
	4. ½ "	17 "	=	97 "	"
	5. ½ "	20 "	=	166 "	"
	6. ½ "	5 "	=	58 "	"
	7. ½ "	1,5 "	=	25 "	"
		Zusammen		0,49 g	

Aus vorstehendem Experiment geht hervor, daß die größere Harnstoffdosis, von der diuretischen Wirkung abgesehen, auch einen glucosurischen Effekt wie beim Urethan zur Folge hat.

Ohne die übrigen in derselben Richtung ausgeführten Experimente beschreiben zu wollen, glaube ich aus denselben den gemeinsamen Schluß ziehen zu können, daß die diuretische Wirkung des Urethans hauptsächlich durch die in demselben vorhandene Harnstoffgruppe bedingt ist; jedoch wirkt diese letztere, in 2 bis 3mal größeren Dosen im Vergleich zum Urethan eingeführt, besonders auf den sensibilisierten Organismus schon glucosurisch, konnte also für meine Zwecke nicht verwendet werden.

C. Aderlaß und Hyperglykämie resp. Glucosurie.

Die von Claude Bernard festgestellte Beziehung zwischen Aderlaß und Glucosurie wurde vielfach bestätigt. Schenk[1]) fand nach der Entziehung von 20 bis 30 ccm Blut bei Kaninchen Steigerung des Zuckers durchschnittlich um 0,067%, wobei er feststellte, daß der Eintritt der Hyperglykämie eine gewisse Zeit erfordert. Die Hyperglykämie war niemals so bedeutend, um Glucosurie hervorzurufen.

Rose[2]) entzog den Versuchstieren 30 bis 40 g Blut und konstatierte gleichfalls eine gewisse Steigerung des Prozent-

---

[1]) Schenk, Arch. f. d. ges. Physiol. 57, 1894.

[2]) Rose, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 50, 1903.

gehaltes des Zuckers, die jedoch sehr unbedeutend war. Anderson[1]) hat in einigen seiner Experimente im Gegenteil sehr starke Hyperglykämie beobachtet (in dem einen Falle Zunahme um 191,7 $^0/_0$ im Vergleich zur Norm: von 0,12 $^0/_0$ bis 0,37 $^0/_0$). Die Quantität des abgelassenen Blutes schwankte in den Grenzen zwischen 20 bis 40 ccm.

Diese Befunde sind für den Wert meiner Experimente nur von geringer Bedeutung, weil ich erstens relativ sehr geringe Blutmengen (3 bis 4 g) verwendete und zweitens die Aderlässe mehrere Male gemacht wurden. In Anbetracht dieses Umstandes führte ich einige Kontrollexperimente aus und machte alle $^1/_2$ Stunden Blutentnahmen. Die Tiere waren in der üblichen Weise festgebunden: Narkose wurde nicht angewendet.

Versuch 17.

Kaninchen ♂, ca. 2800 g Körpergewicht.

Blutzucker normal . . .	0,16 $^0/_0$	
Nach 1. $^1/_2$ Stunde . . .	0,17 „	Der Harn wurde nicht untersucht
„ 2. $^1/_2$ „ . . .	0,16 „	
„ 3. $^1/_2$ „ . . .	0,21 „	
„ 4. $^1/_2$ „ . . .	0,20 „	
„ 5. $^1/_2$ „ . . .	0,22 „	
„ 6. $^1/_2$ „ . . .	0,21 „	

Versuch 18.

Kaninchen ♂, ca. 1600 g Körpergewicht. Katheterisation.

Blutzucker normal . . .	0,18 $^0/_0$	1 ccm Harn, zuckerfrei
Nach 1. $^1/_2$ Stunde . . .	0,20 „	
„ 2. $^1/_2$ „ . . .	0,20 „	0,5 ccm Harn, zuckerfrei
„ 3. $^1/_2$ „ . . .	0,21 „	1 ccm Harn, Zucker in Spuren
„ 4. $^1/_2$ „ . . .	0,18 „	1,2 ccm Harn = 0,02 g Zucker
„ 5. $^1/_2$ „ . . .	0,18 „	1,2 ccm Harn = 0,025 g Zucker
„ 6. $^1/_2$ „ . . .	0,18 „	1 ccm Harn. Zucker —.

Versuch 19.

Kaninchen ♀, ca. 1500 g Körpergewicht.

Blutzucker normal . . .	0,125 $^0/_0$	Keine Glucosurie.
Nach 1. $^1/_2$ Stunde . . .	0,12 „	
„ 2. $^1/_2$ „ . . .	0,12 „	
„ 3. $^1/_2$ „ . . .	0,11 „	
„ 4. $^1/_2$ „ . . .	0,16 „	
„ 5. $^1/_2$ „ . . .	0,14 „	

[1]) Anderson, diese Zeitschr. 12, 1908.

Die vorstehenden Daten stimmen mit (nicht veröffentlichten) Untersuchungen gleicher Bedingungen von Dr. P. Trendelenburg überein.

Die Aderlässe haben somit an und für sich unter den oben geschilderten Versuchsbedingungen zweifellos eine Rolle gespielt, jedoch war ihr Einfluß nicht so bedeutend, um die Gesetzmäßigkeit des Eintrittes und des Grades der Adrenalinglucosurie zu stören. Noch mehr: die Ergebnisse dieser Experimente können ihrerseits die Frage beantworten, warum die nach der Adrenalineinführung eingetretene Glucosurie (resp. Hyperglykämie) nicht immer schnell zur Norm zurückkehrt (siehe oben).

Aus den bisher mitgeteilten Versuchen kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Es läßt sich im allgemeinen Proportionalität zwischen Adrenalinreiz und Zuckermenge konstatieren, und zwar sowohl an der Glucosurie als auch an der Hyperglykämie.

2. Dabei liegt bei Verwendung von Urethannarkose die Schwelle der glucosurischen Adrenalinwirkung unterhalb der Norm.

3. Dabei verlangt der glucosurische Effekt des Adrenalins eine kleinere Reizgröße als die blutdrucksteigernde Wirkung.

4. Einige Minuten nach der Adrenalinzufuhr tritt ausgesprochene Diurese ein, resp. vergrößert sich die schon vorhandene.

5. Der diuretische Effekt von Adrenalin wird öfters, aber nicht immer, von Glucosurie begleitet.

6. Der diuretische Effekt von Urethan ist hauptsächlich den Harnstoffkomponenten zuzuschreiben.

7. Der glucosurische Effekt von Urethan ist nur zum Teil den Harnstoffkomponenten zuzuschreiben.

8. Bei Urethannarkose verschwindet künstlich eingeführter Zucker ungleich langsamer als ohne diese; bei gefesselten Tieren langsamer als bei nicht gefesselten.

9. Der Einfluß des Aderlasses an sich auf Hyperglykämie ist zweifellos, aber nur gering; zuweilen tritt daneben auch Glucosurie ein.

III. Nutzanwendung der kritischen Vorversuche (I. und II.).

A. Versuche mit Adrenalin an nicht narkotisierten Tieren.

Nach der kritischen Prüfung der Versuchsbedingungen ergab sich die Notwendigkeit, den Verlauf der Adrenalinglucosurie resp. Adrenalinhyperglykämie zu studieren, ohne Narkose und harntreibende Mittel überhaupt anzuwenden, d. h. unter normaleren Verhältnissen. Ich kam hierbei zu noch bestimmteren Schlüssen im Sinne eines engen Zusammenhanges zwischen dem Effekt der Adrenalinwirkung und der eingeführten Konzentration.

Versuch 20.

Kaninchen ♂, ca. 1800 g Körpergewicht. Katheterisation usw. Harnmenge sehr gering.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
$1^h 30'$		Normal 0,13 %	
$3^h 20'$ bis $3^h 23'$	Adrenalin 1:2000000, während 3 Min. 30 ccm resp. 10 ccm pro Min. = 5×10^{-6} g pro Min.	Nach 3 Min. 0,14 % „ 30 „ 0,20 %	Von $3^h 20'$ bis $4^h 9'$ keine Glucosurie
$4^h 9'$ bis $4^h 12'$	Adrenalin 1:200000, während 3 Min. 30 ccm resp. 10 ccm pro Min. = 50×10^{-6} g pro Min.	Nach 3 Min. 0,175 % „ 30 „ 0,23 % „ 1 Std. 0,24 %	$4^h 15'$ bis $4^h 25'$ ausgesprochene Diurese ohne Glucosurie Von $4^h 40'$ ab Zucker + In der Nacht 50 ccm Harn Zucker + Harnzuckermenge zusammen = 0,51 g

Versuch 21.

Kaninchen ♂, ca. 1800 g Körpergewicht. Katheterisation usw. Harnmenge sehr gering.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
3^h		Normal 0,15 %	
$3^h 35'$ bis $3^h 42'$	Adrenalin 1:2000000, während 7 Min. 30 ccm resp. ca. 4,3 ccm pro Min. = $2,15 \times 10^{-6}$ g pro Min.	Nach 4 Min. 0,20 % „ 30 „ 0,27 % „ 60 „ 0,275 %	Von $3^h 45'$ ab ausgesprochene Diurese Von $4^h 5'$ ab dazu Glucosurie Am Ende der Stunde Diurese fast abgeklungen Harnzuckermenge während der erst. Stunde $3^h 35'$ bis $4^h 35'$ 0,136 g Zucker. Harnmenge 9 ccm
$4^h 36'$	Adrenalin 1:200000, während 7 Min. 30 ccm resp. ca. 4,3 ccm pro Min. = $21,5 \times 10^{-6}$ g pro Min.	Nach 4 Min. 0,275 % „ 30 „ 0,32 % „ 60 „ 0,35 %	Harnmenge während der zweiten Stunde, d. h. $4^h 36'$ bis $5^h 36'$ 11 ccm = 0,525 g Zucker $5^h 36'$ Versuch abgebroch.

Versuch 22.

Kaninchen ♂, ca. 1600 g Körpergewicht. Katheterisation usw. Harnmenge ungefähr 4 ccm während 1 Stunde.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
12h 20′		Normal 0,18 %	
12h 50′ bis 12h 53′	Adrenalin 1:1000000, während 3 Min. 20 ccm resp. ca. 7 ccm pro Min. = 7×10^{-6} g pro Min.	Nach 7 Min. 0,20 % „ 60 „ 0,24 % „ 2 1/4 Std. 0,24 %	2 bis 3 Min. nach der Einführung ausgesproch. Diurese mit Glucosurie Harnmenge 12h 50′ bis 1h 50′ 30 ccm Harnmenge 1h 50′ bis 3h 5′ 6 ccm Harnzuckermenge 0,54 g Konzentration 1,5 %
3h 15′ bis 3h 18′	Adrenalin 1:100000, während 3 Min. 20 ccm resp. ca. 7 ccm pro Min. = 70×10^{-6} g pro Min.	Nach 7 Min. 0,275 % „ 60 „ 0,27 % „ 2 1/4 Std. 0,30 %	Harnmenge 3h 15′ bis 4h 15′ 4 ccm Harnmenge 4h 15′ bis 5h 30′ 2 ccm Zuckermenge 0,775 g Konzentration 11 %

Versuch 23.

Kaninchen ♀, ca. 200 g Körpergewicht. Katheterisation usw.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
2h 50′		Normal 0,16 %	Harnmenge ca. 1 ccm in 1/2 Std.
3h 1′ bis 2 1/4′	Adrenalin 1:1000000, während 1 1/4 Min. 10 ccm resp. 8 ccm pro Min. = 8×10^{-6} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,175 %	Während 3h 1′ bis 4h 1′ 17 ccm Harn ohne Glucosurie; am Ende der Stunde Diurese fast abgeklungen
4h 1′ bis 2 1/4′	Adrenalin 1:100000, während 1 1/4 Min. 10 ccm resp. 8 ccm pro Min. = 80×10^{-6} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,175 % „ 60 „ 0,22 %	6 bis 7 Min. nach d. Einführung wieder Diurese m. Glucosurie. Harnmenge 4h 1′ bis 5h 1′ 4 ccm = 5 mg Zucker
5h 2′ bis 8 1/4′	Adrenalin 1:100000, während 6 1/4 Min. 50 ccm resp. 8 ccm pro Min. = 80×10^{-6} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,24 % „ 60 „ 0,33 %	5h 2′ bis 5h 20′ keine Diurese 5h 20′ bis 6h 2′ Diurese und Glucosurie. Harnmenge 5h 2′ bis 6h 2′ 4 ccm = 60 mg Zucker

Versuch 24.

Kaninchen ♂, ca. 3000 g Körpergewicht. Katheterisation usw.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
10^h 15′		Normal 0,15 %	Harnmenge sehr gering, ca. 1 ccm in der Stunde
10^h 43′ bis 10^h 53′	Adrenalin 1:1000000, während 10 Min. 20 ccm resp. 2 ccm pro Min. = 2×10^{-6} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,13 % „ 60 „ 0,15 %	Von 10^h 54′ ab sichere Diurese 10^h 54′ bis 11^h 4′ 5 ccm Harn; Zucker — 11^h 4′ Diurese abgeklungen
11^h 45′ bis 11^h 47′	Adrenalin 1:1000000, während 2 Min. 20 ccm resp. 10 ccm pro Min. = 10×10^{-6} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,18 % „ 60 „ 0,19 %	Von 11^h 55′ ab wieder Diurese, dauerte 4 bis 5 Min. Harnmenge 11^h 45′ bis 12^h 45′ 3 ccm Zucker —
12^h 47′ bis 12^h 49′	Adrenalin 1:200000, während 2 Min. 20 ccm resp. 10 ccm pro Min. = 5×10^{-6} g pro Min.	Nach 10 Min. 0,24 % „ 60 „ 0,25 %	12^h 47′ bis 1^h 57′ 2 ccm Harn Zucker — Harn in der Nacht ca. 30 ccm, zuckerfrei

Versuch 25.

Kaninchen ♂, ca. 2000 g Körpergewicht. Katheterisation usw.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
11^h 40′		Normal 0,125 %	Keine Diurese
11^h 50′ bis 12^h	Adrenalin 1:1000000, während 10 Min. 20 ccm resp. 2 ccm pro Min. = 2×10^{-6} g pro Min.	Nach 5 Min. 0,17 % „ 60 „ 0,12 %	Keine Diurese 11^h 50′ bis 12^h 50′
12^h 53′ bis 55 1/2′	Adrenalin 1:1000000, während 2 1/2 Min. 20 ccm resp. 8 ccm pro Min. = 8×10^{-6} g pro Min.	Nach 5 Min. 0,19 % „ 60 „ 0,13 % „ 2 1/4 Std. 0,16 %	Harnmenge 5 ccm, zuckerfrei
2^h 15′ bis 17 1/2′	Adrenalin 1:200000, während 2 1/2 Min. 20 ccm resp. 8 ccm pro Min. = 40×10^{-6} g pro Min.	Nach 5 Min. 0,20 % „ 60 „ 0,24 % „ 2 1/4 Std. 0,18 %	2^h 30′ Harnblase durchgespült: Harn zuckerfrei. 2^h 40′ Harnblase durchgespült: Harn zuckerhalt. Harnzuckermenge von 2^h 40′ bis 5^h 30′ 0,2 g 10 ccm Harn in der Nacht, zuckerfrei

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des vorstehenden Experimentes ergibt sich besonders deutlich der auf- und absteigende Gang der Hyperglykämie, deren Intensität und Dauer voll und ganz von der eingeführten Adrenalindosis abhängen. Bei der Einführung einer stärkeren Konzentration tritt Glucosurie ein, die bei der Einführung einer schwächeren Konzentration fehlte. Um das Experiment besser zu veranschaulichen, habe ich dasselbe graphisch (Fig. 1) dargestellt.

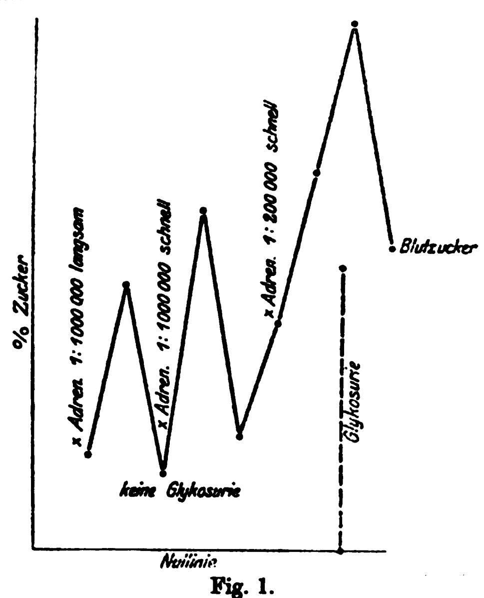


Fig. 1.

Versuch 26.

Kaninchen ♂, ca. 1800 g Körpergewicht. Katheterisation usw.

Zeit	Infusion	Blutzucker	Harn
$4^h\,1'$		Normal 0,125 %	
$4^h\,41'$ bis $4^h\,44'$	Adrenalin 1:1000000, während 3 Min. 30 ccm resp. 10 ccm pro Min. = 10×10^{-6} g pro Min. Nach der Einführung abgebunden	Nach 10 Min. 0,14 % „ 60 „ 0,19 %	$4^h\,41'$ bis $5^h\,41'$ Harnmenge 2 ccm, zuckerfrei
$5^h\,51'$ bis $5^h\,44'$	Adrenalin 1:100000, während 3 Min. 30 ccm resp. 10 ccm pro Min. = 100×10^{-6} g pro Min. Nach der Einführung abgebunden	Nach 10 Min. 0,175 % „ 60 „ 0,225 %	$5^h\,41'$ bis $6^h\,41'$ Harnmenge 3 ccm = 0,08 g Zucker

Der Unterschied in der Versuchsanordnung bestand in diesem Falle darin, daß das Kaninchen unmittelbar nach der Adrenalineinführung abgebunden wurde. Der Grad der Glucosurie und Hyperglykämie war im Vergleich mit anderen Versuchen weniger ausgeprägt.

Aus den beschriebenen Versuchen (20 bis 26) glauben wir folgende Schlüsse ziehen zu können:

1. Die Proportionalität zwischen Größe des Adrenalinreizes und gebildeter Zuckermenge kommt an nichtnarkotisierten Tieren deutlicher zutage, als an narkotisierten.

2. Hypergylykämie ist die primäre Erscheinung und verursacht die Glucosurie.

3. Bei ganz fehlender Glucosurie kann in vielen Fällen ziemlich bedeutende Hyperglykämie existieren (bis 0,2%); bei höherem Grade der Hyperglykämie tritt Glucosurie ein.

4. Die glucosurische Schwelle des Adrenalinreizes liegt bei Normalbedingungen bedeutend höher als bei Urethannarkose.

5. Die diuretische Wirkung (resp. Nachwirkung) des Adrenalins ist eine gesetzmäßige Erscheinung und von der glucosurischen unabhängig.

Einige Besonderheiten in unseren Versuchen sind noch zu diskutieren. Wie schon erwähnt, beobachtete ich als gesetzmäßige Erscheinung eine mehr oder minder stark ausgesprochene Diurese, die durchschnittlich 5 bis 6 Minuten nach der Adrenalineinführung sich einzustellen pflegte. Bisweilen wurde dieselbe von Anfang an von Glucosurie begleitet, bisweilen gesellte sich diese letztere erst später hinzu. Diese Tatsache stimmt mit Beobachtungen der übrigen Autoren überein. Schatilow[1]) hebt hervor, daß der Einfluß des Adrenalins auf die Harnabsonderung ziemlich inkonstant ist, daß aber toxische Adrenalindosen stets Diuresen zur Folge haben. Schlayer[2]) hat bei der intravenösen Adrenalineinführung einen diuretischen Effekt beobachtet. Fleischer und Loeb[3]) führten Tieren eine mit Adrenalin versetzte Salzlösung ein und beobachteten Vergrößerung der Harnmenge, sowie Ascites. Einen stark ausgeprägten diuretischen Effekt nach intraperitonealer und subcutaner Adrenalineinführung hat bei Meerschweinchen Welecki[4]) beobachtet. Hiermit stimmen auch die Annahmen Biberfelds[5]) überein, der bei subcutaner Einführung von 1,5 bis 2,5 mg Adrenalin bei Kaninchen $^1/_2$ bis 1 Stunde nach der Einführung

[1]) Schatilow, Arch. f. Physiol. **1908**.

[2]) Schlayer, Münch. med. Wochenschr. **55**, 1908.

[3]) Fleischer und Loeb, Journ. of experimental Medicine **1909**. Zit. nach dem Biochem. Centralbl. **9**, 1909/10.

[4]) Welecki, Anz. d. Akad. Krakau **1909**. Zit. nach Biochem. Centralbl. **9**, 1909/10.

[5]) Biberfeld, Arch. f. d. ges. Physiol. **119**.

hochgradige Diurese beobachtete, die in der Mehrzahl der Fälle von Glucosurie begleitet wurde. Ebenso läßt sich in den Versuchen von Pick und Pineles[1]) in einigen Fällen nach der subcutanen Adrenalinapplikation stark ausgesprochene Diurese konstatieren.

Die unmittelbare Ursache der diuretischen Wirkung des Adrenalins ist noch nicht bekannt. Eine der Ursachen muß man in der Erregung der Dilatatoren der Nierengefäße erblicken, weil die Diurese stets nach Ablauf eines gewissen Zeitraumes nach der Einführung und nicht während der Einführung des Giftes eintritt. Die Erscheinung ist wohl dem Sinken des Blutdruckes unter die Norm, d. h. der Erregung des dilatatorischen Systems nach der Unterbrechung des Adrenalinstromes analog. Außerdem könnte die Glucosurie an und für sich (vgl. die Experimente mit Zuckereinführung) den diuretischen Effekt steigern.

Als häufige Erscheinung beobachteten wir das Vorkommen von Hyperglykämie ohne Glucosurie. Nur bei stärkeren Graden von Hyperglykämie tritt im Harn Zucker auf.

Diese Tatsache haben bereits andere Autoren angegeben. So haben Liefmann und Stern[2]) dieselbe bei Menschen beim Diabetes beobachtet und halten sie in pathologischer Beziehung für wichtig, weil trotz des Fehlens von äußeren Symptomen im kranken Organismus hochgradige Störungen des Stoffwechsels bestehen können.

Von den Experimentalforschern hat Pollak[3]) auf die Erscheinung aufmerksam gemacht, der nach intravenöser Adrenalineinführung bei Kaninchen Hyperglykämie ohne Glucosurie beobachtete. Wenn aber gleichzeitig Diurese erzeugt wird, so tritt auch Glucosurie ein (man kann nicht umhin, darin eine Analogie mit dem von mir im Vergleich zu demjenigen unter normalen Verhältnissen etwas früheren Eintritt der Glucosurie bei Urethannarkose resp. bei künstlich erzeugter Diurese zu erblicken). Nach Pollak (l. c.) führt Hyperglykämie, die 0,25 % Zucker übersteigt, gewöhnlich an und für sich zu Glucosurie (Beispiel: subcutane Adrenalinapplikation).

Besonders erwähnenswert ist die Frage des normalen Zuckergehaltes im Blute von Kaninchen. In der Mehrzahl

---

[1]) Pick und Pineles, diese Zeitschr. **12**, 1908.

[2]) Liefmann und Stern, diese Zeitschr. **1906**.

[3]) Pollak, Arch. f. experim. Pathol. **61**, 1909 und **64**, 1911.

meiner Beobachtungen bekam ich Zahlen von 0,12°/₀ bis 0,18°/₀, also Zahlen, die etwas höher sind als diejenigen, die von den übrigen Autoren angegeben werden: 0,15°/₀ (Maximum) nach den Angaben von Rose (l. c.) (Bestimmung nach Knapp), 0,12°/₀ (Maximum) nach Frank und Isaak[1]) (Bestimmung nach Bertrand), 0,131°/₀ (im Durchschnitt nach der Sensibilisierung mit Zucker) nach Nishi[2]), 0,12°/₀ bis 0,14°/₀ nach Anderson (l. c.) (Bestimmung nach Bang). Bei der Bewertung meiner Zahlen muß man im Auge behalten, daß die Methode von Bang, die ich verwendete, überhaupt höhere Reduktionsnormen ergibt im Vergleich mit der polarimetrischen Methode (nach Oppler und Rona[3]) beispielsweise 0,094°/₀ nach der polarimetrischen Methode und 0,125°/₀ nach der Methode von Bang) und der Methode von Bertrand (Frank und Bretschneider[4]). In manchen Fällen erhielt ich bei der Urethannarkose und künstlicher Sensibilisierung des Tieres noch höhere Normen für den Blutzucker.

Wenn man sämtliche Fehler-Korrekturen resp. -Quellen in Betracht zieht, so kann man meiner Meinung nach auf Grund sämtlicher vorstehenden Ausführungen als feststehend betrachten, daß zwischen der Konzentration resp. der Schnelligkeit der Einführung des Adrenalins in das Blut und der Menge des im Organismus mobilisierten Zuckers eine direkte Proportionalität besteht. Diese Proportionalität blieb jedoch, wie aus meinen Experimenten ersichtlich ist, unter der erwarteten: die Ursache muß vor allem in der Erschöpfung des Zuckervorrates resp. des Glykogens in der Leber bei wiederholter Adrenalineinführung gesucht werden, außerdem in der unter dem Einflusse des Adrenalins eintretenden Steigerung der Verbrennnng der Kohlenhydrate, wie dies aus dem Gasstoffwechsel hervorgeht (Langlois und Garrelon[5]), Hari[6]).

Ferner kann nach Fisher und Moore[7]) die Ausscheidung des abnorm gesteigerten Zuckergehaltes aus dem Blute auch

[1]) Frank und Isaak, Zeitschr. f. experim. Pathol. 7, 1909.

[2]) Nishi, Arch. f. experim. Pathol. 61, 1909.

[3]) Oppler und Rona, diese Zeitschr. 12, 1908.

[4]) Frank und Bretschneider, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 1911.

[5]) Langlais et Garrelon, Compt. rend. hebdomadaires de la Société de Biologie 68, 1910.

[6]) Hari, diese Zeitschr. 38, 1912.

[7]) Fisher and Moore, American Journ. of Physiol. 19, 1907.

durch den Darmkanal vor sich gehen. Man kann also annehmen, daß die Proportionalität noch augenscheinlicher gewesen wäre, wenn es möglich gewesen wäre, die vollständige Bilanz des mobilisierten Zuckers zu ziehen.

Das Studium der quantitativen Wechselbeziehungen zwischen der Dosis des Giftes und dessen Wirkung ist in unserem Falle von besonderer Bedeutung aus dem Grunde, weil das Adrenalin eine Substanz ist, die von den Geweben des Organismus rasch zerstört resp. inaktiviert wird (Embden und Fürth[1]), Livon[2]), Gioffredi[3]) Gautrelet und Thomas[4]), Kretschmer (l. c.), Jackson[5]), Connor[6]). Noch mehr, nach den Untersuchungen von P. Trendelenburg[7]), kann man als feststehend betrachten, daß die so charakteristische Wirkung des Adrenalins auf den Blutdruck resp. die Schnelligkeit des Eintretens und des Aufhörens dieser Wirkung lediglich durch das Vorhandensein oder Fehlen des Giftes im Blute erklärt wird und daß zur Zeit der Wiederherstellung des normalen Blutdruckes das Adrenalin als solches bereits vollständig verschwunden ist. Somit konnte auch in unserem Falle beim vergleichenden Studium der Wirkung der verschiedenen Adrenalinkonzentrationen auf die Zuckermobilisierung im Organismus das Gift nur während seiner Anwesenheit im Blute wirken, und der Effekt dieser Wirkung konnte nur durch die verschiedenen Konzentrationen, während eines streng bestimmten Zeitraumes, zwischen dem äußeren Medium, d. h. dem Blute und den spezifischen der Wirkung des Giftes unterliegenden Zellen des Organismus bedingt sein.

Es wäre angebracht, an dieser Stelle mit einigen Worten auf den gegenwärtigen Stand der Frage des Mechanismus der Adrenalinwirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel einzugehen.

Vor allem ist es absolut sicher, daß das Vorhandensein und der Grad der Adrenalinhyperglykämie resp. Adrenalinglucosurie vom Glykogengehalt in der Leber abhängt [Vosbourgh und

[1]) Embden und Fürth, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 4.
[2]) Livon, Compt. rend. hebdomadaires des céances de la Soc. de Biol. 56.
[3]) Gioffredi, Arch. Farmacol. 1907. Zit. nach d. Biochem. Centralbl. 6, 1907.
[4]) Gautrelet et Thomas, Compt. rend. de l'Acad. de Sciences 1911.
[5]) Jackson, Americ. Journ. of Physiol. 1909.
[6]) Connor, Arch. f. experim. Pathol. 67, 1912.
[7]) P. Trendelenburg, Arch. f. experim. Pathol. 1910.

Richards[1]), Wolownik[2]), Bierry und Gatin-Gruzewska[3]), Doyon, Morel und Kareff[4]), Doyon und Gautier[5]), Ritzmann (l. c.), Frank und Isaak (l. c.), Pollak (l. c.)], wobei die Wirkung des Giftes auf den Chemismus der Zuckermobilisation keine unmittelbare ist. Diese Wirkung wird ausschließlich durch die Nerven, nämlich durch die Erregung des N. sympathicus, und zwar der Endungen derselben in der Leber erreicht (Elliot[6]), Underhill und Closson[7]), Doyon und Gautier, Straub (l. c.), Cushny[8]), Frank und Isaak (l. c.), Ritzmann (l. c.), Pollak (l. c.), Radwańska[9]), Lichtwitz[10]). In dieser Beziehung kommt eine entscheidende Bedeutung der Arbeit von Pollak zu, der durch genaue experimentelle Untersuchungen die peripherische Entstehung der Adrenalinglucosurie nachgewiesen hat, die auch bei Durchschneidung des N. splanchnicus eintritt, wo die nach dem Typus der Piqûre verlaufende Coffeinglucosurie schon nicht mehr hervorgerufen werden kann. Die ursächliche Abhängigkeit der Hyperglykämie resp. Glucosurie von den Endverzweigungen des N. sympathicus in der Leber ist ebenso anschaulich durch die Arbeit von Macleod[11]) erwiesen. Dieser Autor reizte den N. splanchnicus elektrisch und beobachtete, daß innerhalb einer halben Stunde Hyperglykämie mit allen ihren weiteren Folgen (analog meinen Experimenten, wo wir es mit einem chemischen Reiz zu tun hatten) eintrat. Nach Durchschneidung der Nervenbündel, die zur Leber verliefen, wurde diese Erscheinung nicht beobachtet.

Schließlich hat Ivanoff[12]) gesteigerten Glykogenzerfall bei Einwirkung von Adrenalin auf die isolierte Leber, d. h. die peripherische Natur der Adrenalinwirkung nachgewiesen.

---

1) Vosbourgh and Richards, Amer. Journ. of Physiol. 9, 1903.

2) Wolownik, Virchows Archiv 180.

3) Bierry et Gatin-Gruzewska, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 58.

4) Doyon, Morel et Kareff, Journ. de Physiologie et de Pathologie générale 7, 1905.

5) Doyon et Gautier, Compt. rend. hebd. de la Soc. de Biol. 1908.

6) Elliot, Journ. of Physiol. 31, 1904.

7) Underhill and Closson, Amer. Journ. of Physiol. 12, 1906.

8) Cushny, Journ. of Physiol. 1908.

9) Radwanska, Anzeigen der Akad. Krakau 1910. Zit. nach d. Biochem. Centralbl. 11, 1910/11.

10) Lichtwitz, Arch. f. experim. Pathol. 65.

11) Macleod, Amer. Journ. of Physiol. 22, 1908.

12) Ivanoff, Biochem. Centralbl. 1905 und russ. Dissertation 1905.

Was die Frage des unmittelbaren Mechanismus der Adrenalinwirkung auf das Lebergewebe betrifft, so schreiben einige Autoren [Macleod (l. c.), Ringer[1]], von der Erregung der den Kohlenhydratstoffwechsel kontrollierenden Endungen der sekretorischen Nerven abgesehen, noch einem anderen Moment eine gewisse Rolle zu, nämlich der unter dem Einflusse des Adrenalins eintretenden Anämie resp. Asphyxie der Leberzellen, wodurch eine Herabsetzung der oxydativen Prozesse und die Hyperglykämie eintritt.

In Anbetracht der außerordentlich raschen Zerstörbarkeit des Adrenalins in den Geweben, wodurch ein Gleichgewicht zwischen der Verteilung des im Blute — bei ununterbrochener Einführung — zirkulierenden Giftes und dem Objekt seiner Wirkung, nämlich den Leberzellen, nicht Platz greifen kann, und von dem Standpunkte ausgehend, daß die Proportionalität zwischen der Dosis des Giftes und dessen Wirkung im Prinzip erwiesen ist, gelange ich zu dem Schlusse, daß die Intensität der Giftwirkung von der Differenz der Konzentrationen, die zwischen dem Blute und den Leberzellen jeweilig besteht, d. h. von der andauernden, der Konzentration proportionalen Erregung der spezifischen Elemente abhängt. Mit anderen Worten: das Adrenalin wirkt als Reizgift im Sinne der Theorie von Straub[2]), wobei der Organismus auf den jeweiligen Grad der Nervenerregung mit einer chemischen Reaktion von entsprechender Intensität antwortet.

Natürlich versteht es sich hier von selbst, daß der höchste Grad der Hyperglykämie und der durch dieselbe bedingten Glucosurie mit dem Maximum der Wirkung auf den Blutdruck resp. auf die übrigen Abschnitte des sympathischen Nervensystems zeitlich nicht zu kongruieren braucht, daß diese komplizierte chemische Reaktion protrahiert vor sich geht, in ihrem ganzen Umfange dem Studium nicht zugängig ist und außerdem, wie wir gesehen haben, von einer Reihe anderer Nebenerscheinungen begleitet wird, die ihrerseits den aus dem Gleichgewicht gebrachten Kohenhydratstoffwechsel beeinflussen können.

---

[1]) Ringer, Journ. of experimental Medicine 12. Zit. nach d. Biochem. Centralbl. 10, 1910.

[2]) Straub, Arch. f. d. ges. Physiol. 119, 1907.

Über die Entstehung von Phenol aus Parakresol im Organismus des Hundes.

Von

M. Siegfried und **R. Zimmermann.**

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 2. September 1912.)

Als Muttersubstanz des im Harne vorkommenden p-Kresols und Phenols, bzw. ihrer Ätherschwefelsäuren und Glucuronsäureverbindungen wird das Tyrosin angesehen. Nach der Lehre Baumanns geht das Tyrosin, das aus dem Eiweiß abgespalten wird, im Organismus in Kresol, Paroxybenzoesäure und zum kleinen Teil in Phenol über. Aus dem Kresol soll die Paroxybenzoesäure entstehen und aus dieser unter Abspaltung von Kohlensäure das Phenol. Ebenso wie nach Baumann[1]) aus verfütterter Paroxybenzoesäure nur wenig Phenol entsteht, soll normalerweise das aus Tyrosin entstandene Parakresol nur in geringem Grade in Phenol übergehen, wodurch der bisher angenommene geringe Phenolgehalt des Harnes im Vergleich zum Kresolgehalte erklärt wird.

Wir haben kürzlich[2]) nachgewiesen, daß die Ansicht, daß nur etwa 15% der Gesamtphenole aus Phenol bestehen, nicht aufrechterhalten werden kann. Während sich Baumann nur auf die Ergebnisse seiner präparativen Untersuchungen stützen konnte, setzte uns unsere Methode zur getrennten Bestimmung des Kresols und Phenols im Harne in den Stand, in exakter Weise die Mengen der einzelnen Phenole zu ermitteln. Wir fanden als Mittel der Untersuchung von 9 gemischten menschlichen Harnen 41,9% Phenol der Gesamtphenole.

---

[1]) E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **3**, 250, 1879.

[2]) M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. **34**, 462, 1911.

Die Anschauung, daß das im Harne vorkommende Phenol aus zunächst gebildetem p-Kresol entsteht, ist bisher nicht begründet. Zwar finden sich in der Literatur Angaben, daß Weyl[1]) durch Fäulnis aus Tyrosin neben p-Kresol Phenol erhalten habe, und daß Baumann[2]) nachgewiesen habe, daß aus p-Kresol im Tierkörper Phenol entsteht. Dem ist aber nicht so. Denn Weyl spricht zwar im Laufe seiner Untersuchung von ‚Phenol', das er apostrophiert, meint aber damit Phenol im allgemeinen Sinne, ein Phenol, und weist dann nach und hebt dies ausdrücklich hervor, daß das ‚Phenol' weder C_6H_5OH sei noch enthalte, sondern daß es lediglich aus p-Kresol bestünde.

Baumann erhält nach Verfütterung von 4 g Paroxybenzoesäure an einen Hund aus dem Harne desselben nach Destillation mit Salzsäure eine Bromfällung, mit der er weiter nichts angestellt hat, als daß er sie gewogen hat. Ohne Berechtigung sieht er sie als Tribromphenol an und berechnet aus ihrem Gewichte 0,035 g Phenol. Früher hatte er mit Herter[3]) nach Verfütterung von 6 g paroxybenzoesaurem Natron im Säuredestillate des Harnes ebenfalls einen geringen Niederschlag mit Bromwasser erhalten.

Indem Baumann annimmt, daß dieser Bromniederschlag Tribromphenol sei, schließt er, da er nach Verfütterung von p-Kresol im Harne Paroxybenzoesäure findet, daß p-Kresol über die Paroxybenzoesäure zu Phenol oxydiert werde.

Man sieht also, daß die auf die Untersuchungen Baumanns sich stützende Anschauung, daß p-Kresol im tierischen Organismus in Phenol wenigstens zum Teil übergeht, keineswegs begründet ist. Im Gegenteil besteht die Möglichkeit, daß das Phenol des Harnes anderen Ursprunges als das gleichzeitig vorkommende p-Kresol ist.

Die Frage: Entsteht aus p-Kresol im tierischen Körper Phenol? zu beantworten, erschien uns aus zweierlei Gründen erstrebenswert. Erstens würde die Bejahung dieser Frage die Berechtigung der herrschenden Ansicht, daß das Phenol des

---

[1]) Th. Weyl, Zeitschr. f. physiol Chem. 3, 312, 1879.

[2]) l. c.

[3]) E. Baumann und E. Herter, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 224, 1877.

Harnes derselben Quelle wie das p-Kresol, der Tyrosingruppe des Eiweißes entstammt, ergeben. Zweitens würde, wenn Phenol im Organismus aus Kresol entsteht, ein Weg eröffnet werden, durch quantitative Bestimmung des neben Kresol im Harne auftretenden Phenols einen Schluß auf die Intensität der Oxydationsvorgänge im Organismus zu ziehen. Denn das Phenol kann nur durch Oxydation aus dem Kresol entstehen, wobei es nicht notwendig ist, daß als Zwischenstufe Paroxybenzoesäure im Sinne Baumanns auftritt.

$$C_6H_4 \begin{matrix} \diagup CH_3 \\ \diagdown OH \end{matrix} + O_2 = C_6H_5OH + CO_2 + H_2O.$$

Auf der einen Seite ist zu erwarten, daß, je mehr Phenol neben Kresol im Harne auftritt, um so größer die Oxydationsvorgänge im Organismus sind, auf der anderen Seite ist zu berücksichtigen, daß Phenol selbst weiter unter Bildung von Hydrochinon[1]) oxydiert wird, und daß daher, je intensiver die Oxydationen im Organismus sind, um so mehr zunächst aus Kresol gebildetes Phenol weiter oxydiert werden kann, wenn nicht etwa diese Oxydation, so lange noch Kresol vorhanden ist, unterbleibt.

Wenn das Verhältnis Phenol:Kresol von dem Grade der Oxydationsvorgänge abhängig ist, müßte man erwarten, daß dieses Verhältnis bei verschiedenen Individuen ein sehr abweichendes ist. Auf diese Möglichkeit haben wir bereits bei Veröffentlichung unserer Untersuchungen über den Kresol- und Phenolgehalt des gemischten menschlichen Harnes hingewiesen[2]). Die inzwischen bei Harnen einzelner Individuen ausgeführten Bestimmungen, über die wir demnächst berichten werden, haben solche abweichenden Verhältnisse ergeben.

Um festzustellen, ob Phenol aus p-Kresol entsteht, haben wir Hunden p-Kresol verfüttert und in dem während der Versuchsperioden gesammelten Harne getrennt Kresol und Phenol quantitativ bestimmt. Nach den Angaben der Literatur, z. B. von Baumann[3]) Jonescu[4]), enthält der Harn von Hunden

---

[1]) Baumann und C. Preusse, Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 156, 1879.

[2]) Diese Zeitschr. 34, 472, 1911.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 252, 1879.

[4]) D. Jonescu, diese Zeitschr. 1, 399, 1906.

überhaupt keine Phenole, kein Kresol und Phenol; nach unseren Analysen der Vorperioden nur sehr wenig (s. u.), so daß das Auftreten von Phenol im Harne nach Verfütterung von p-Kresol anzeigt, daß Phenol aus p-Kresol entstanden ist.

Über die Versuche selbst wird im experimentellen Teile berichtet. Wie bei den geringen täglich verfütterten Dosen nicht anders zu erwarten war, zeigten die Versuchstiere keinerlei Vergiftungserscheinungen, es traten weder Erbrechen noch Krämpfe ein. Auch die Freßlust war eine gleichmäßig gute.

Sämtliche Versuche ergaben, daß nach Verfütterung von p-Kresol Phenol im Harne auftritt, und zwar in bedeutenden Mengen. Relativ betrugen diese von der Summe der Gesamtphenole (Kresol + Phenol) 23 bis 46°/₀, und die Menge der Gesamtphenole von der Menge des verfütterten Kresols 32 bis 48°/₀. Es handelt sich also um eine Reaktion des tierischen Organismus, die in erheblichem Umfange verläuft.

Es ist somit bewiesen, daß der Organismus des Hundes Phenol aus p-Kresol zu bilden vermag.

Die Summe der ausgeschiedenen Phenole ist prozentuarisch größer, als sie Jonescu[1]) und Friedländer[2]) gefunden haben. Wir haben bei den einzelnen Fütterungsversuchen 32°/₀, 48°/₀, 37,5°/₀, 34°/₀, 37°/₀, 38°/₀ Gesamtphenole von dem verfütterten p-Kresol erhalten, während Jonescu in seinen beiden Versuchen nur 23,5°/₀ und 27,2°/₀ fand. Da die Jonescu zur Verfügung stehende Methode lediglich die Bestimmung der Gesamtphenole gestattete, sind die erhaltenen Werte ganz auf Kresol berechnet, wodurch die Zahlen noch etwas erhöht worden sind. Diese wesentlichen Differenzen würden leicht ihre Erklärung finden, wenn wir relativ größere Mengen Kresol auf das Körpergewicht der Hunde berechnet als Jonescu gegeben hätten. Aber gerade das Gegenteil ist der Fall. Das Versuchstier Jonescus wog 11,96 kg, unsere Tiere wogen 23,2 und 21,5 kg. Jonescu gab täglich 1 g, im ganzen 3 g bei jeder Fütterungsperiode, wir täglich 0,5 bis 0,8 g, im ganzen 2 g bis 4,8 g.

Man wird also individuelle Verschiedenheiten des Oxydationsvermögens der verschiedenen Versuchstiere gegen Kresol anzunehmen haben.

---

[1]) l. c.

[2]) A. Friedländer, Therap. Monatsh. 22, 366, 1908.

Wir haben an diese Versuche noch eine Periode angeschlossen, in der wir Paroxybenzoesäure verfütterten. Wenn p-Kresol über die Paroxybenzoesäure in Phenol übergeht, so wäre zu erwarten, daß nach Verfütterung von Paroxybenzoesäure ähnliche Mengen Phenol wie nach Verfütterung von p-Kresol im Harne auftreten. Der Versuch ergab jedoch nur weniger als 0,8% Phenol der verfütterten Paroxybenzoesäure. Daneben wurde auch Kresol vermehrt gefunden. Wir geben dieses Resultat mit Vorbehalt an, da wir bisher nur diesen einen Versuch anstellen konnten.

Experimentelles.

Die Versuchstiere wurden in einem großen Käfig gehalten, aus dem der Harn in eine untergestellte Flasche sogleich ablief. In dieser Flasche befand sich von Anfang an Chloroform; sie wurde täglich geleert. Im Käfig war über der Ausflußöffnung ein aus verzinktem Bleche hergestellter ‚Eckstein', der von vornherein mit Hundeharn bestrichen war, angebracht, wodurch die Versuchstiere veranlaßt wurden, an dieser Stelle zu harnen.

Gefüttert wurden die Tiere in den Vor-, Fütterungs- und Zwischenperioden gleichmäßig mit Fleisch und Knochen.

Die Verarbeitung des Harnes geschah, wie früher angegeben[1]); vor dem Eindampfen wurde er mit einem großen Überschuß von Ätznatron versetzt (s. S. 221). Das letzte Destillat wurde nach dem Eindampfen mit Natronlauge auf 200 ccm aufgefüllt, je 100 ccm zur Bestimmung von b_1 und b_2 verwendet. Nebenbei wurde das spezifische Gewicht und der N-Gehalt des Harnes bestimmt. Bei letzterer Bestimmung wurden je 2 ccm Harn unter Zusatz von Kaliumsulfat und Kaliumpermanganat kjeldahlisiert.

I. Versuchsreihe.

Hund 1, männlich. Gewicht 23,2 kg.

A. Vorperiode.

Erste Harnmenge 2,8 l. D = 1,039 bei 20°, N = 44,75 g in 1 l.

$b_1 = 0,0332$ $b_2 = 0,0315$

Kresol: 0,0022 g, Phenol 0,0110 g in 2,8 l Harn.

---

[1]) M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. 34, 469, 1911.

Zweite Harmenge 3 l. $D = 1{,}042$ bei 20°, $N = 41{,}00$ g in 1 l.

$$b_1 = 0{,}0446 \qquad b_2 = 0{,}0377.$$

Kresol: 0,0094 g, Phenol: 0,0094 g in 3 l.

B. Erste Fütterungsperiode.

Das hier und bei den späteren Versuchen verwendete p-Kresol war p-Kresol ‚Kahlbaum' und von uns durch Fp. und Sdp. kontrolliert. Es wurde stets mit der gleichen Gewichtsmenge (d. i. etwas mehr als 1 Mol.) Natriumbicarbonat in Gelatinekapseln in ein Stück Fleisch gesteckt dem Hund direkt ins Maul verfüttert. Die Hunde verschlangen sofort das betreffende Stück Fleisch.

Der Hund erhielt an vier aufeinanderfolgenden Tagen (1 bis 4. XI. 1911) je 0,5 g p-Kresol mit 0,5 g Natriumbicarbonat. Die Menge des vom Beginn der Fütterung bis zum 6. Tage früh gesammelten Harnes betrug 2,63 l.

$$D = 1{,}049 \text{ bei } 17^\circ, \quad N = 45{,}28 \text{ g im Liter.}$$

Der Harn wurde auf 3 l mit Wasser aufgefüllt, je 342 ccm = 300 ccm unverdünnten Harnes dienten zu jeder Bestimmung.

a) $b_1 = 0{,}1635 \qquad b_2 = 0{,}1252$

Kresol: 0,0518 g, Phenol: 0,0190 g in 300 ccm Harn.
Phenol: 26,8 % der Gesamtphenole.

b) $b_1 = 0{,}1741 \qquad b_2 = 0{,}1335.$

Kresol: 0,0548 g, Phenol: 0,0206 g in 300 ccm Harn.
Phenol: 27,3 % der Gesamtphenole.

Aus a und b Gesamtphenole für 300 ccm Harn: 0,0731, für den Gesamtharn: 0,641 g, also 32 % von dem verfütterten Kresol.

C. Zweite Fütterungsperiode.

An vier aufeinanderfolgenden Tagen (6. bis 9. XII. 1911) wurden demselben Hunde je 0,8 g p-Kresol, mit 0,8 g Natriumbicarbonat vermischt, verfüttert. Der Harn wurde bis 11. XII. früh gesammelt. Vol.: 4,2 l.

$$D = 1{,}037 \text{ bei } 14^\circ, \quad N = 31{,}77 \text{ g im Liter.}$$

Angewandt: 400 ccm Harn.

$b_1 = 0{,}3347$ $b_2 = 0{,}2584$.

Kresol: 0,1032 g, Phenol: 0,0414 in 400 ccm Harn.
Phenol: 28,6 % der Gesamtphenole.
Gesamtphenole 0,1446 g in 400 ccm Harn, 1,52 g in 4,2 l = 48 % von dem verfütterten Kresol.

II. Versuchsreihe.

Hund 2, männlich. Gewicht 21,5 kg.

A. Vorperiode.

D des Harnes = 1,047 bei 14°, N = 37,77 g im Liter.
Angewandt: 1 l Harn.

$b_1 = 0{,}0076$ $b_2 = 0{,}0058$.

Kresol: 0,0024 g, Phenol: 0,0008 g in 1 l Harn.

A. Erste Fütterungsperiode.

Vom 29. I. bis 3. II. 1912 inkl. je 0,5 g p-Kresol + 0,5 g Natriumbicarbonat täglich. Harn vom 29. I. bis 5. II. 1912 früh gesammelt. Vol.: 3,37 l.

D = 1,053 bei 10°, N = 46,75 g im Liter.

Angewandt: 300 ccm Harn zu jeder Analyse.

a) $b_1 = 0{,}2870$ $b_2 = 0{,}2267$.

Kresol: 0,0816, Phenol: 0,0416 g in 300 ccm Harn.
Phenol: 33,8 % der Gesamtphenole.

b) $b_1 = 0{,}2670$ $b_2 = 0{,}2143$.

Kresol: 0,0712, Phenol: 0,0428 in 300 ccm Harn.
Phenol: 37,5 % der Gesamtphenole.
Gesamtphenole in 300 ccm; Mittel der beiden Bestimmungen: 0,1186 g; in 3,37 l Harn = 1,332 g = 44 % des verfütterten Kresols.

B. Zwischenperiode.

D des Harnes = 1,050 bei 18°, N = 45,21 g im Liter.
Angewandte Menge Harn: 500 ccm.

$b_1 = 0{,}0163$ $b_2 = 0{,}0103$ g.

Kresol: 0,0082 g, Phenol 0,0000 g in 500 ccm Harn.

C. Zweite Fütterungsperiode.

Vom 8. II. bis 13. II. 1912 inkl. je 0,5 g p-Kresol + 0,5 g Natriumbicarbonat täglich gefüttert. Harn vom 8. bis 15. II früh gesammelt. Vol.: 3,63 l.

D = 1,047 bei 10°, N = 45,91 g im Liter.

Zu jeder Bestimmung 300 ccm Harn verwendet.

a) $b_1 = 0{,}1946$ $b_2 = 0{,}1620$.

Kresol: 0,0440 g, Phenol: 0,0380 g in 300 ccm Harn.
Phenol: 46,3 % der Gesamtphenole.

b) $b_1 = 0{,}1996$ $b_2 = 0{,}1660$.

Kresol: 0,0454 g, Phenol: 0,0388 g in 300 ccm.
Phenol: 46,1 % der Gesamtphenole.

Gesamtphenole als Mittel beider Bestimmungen: 0,0831 g in 300 ccm und 1,01 g in 3,63 l = 34 % des verfütterten Kresols.

D. Zwischenperiode.

D des Harnes = 1,051 bei 17°, N = 38,63 g im Liter.
Angewandt: 500 ccm Harn.

$b_1 = 0{,}0347$ $b_2 = 0{,}0264$.

Kresol: 0,0112 g, Phenol: 0,0038 g in 500 ccm Harn.

E. Dritte Fütterungsperiode.

Vom 21. bis 26. II. 1912 inkl. täglich 0,8 g Kresol + 0,8 g Natriumbicarbonat. Der Harn wurde vom 21. bis 28. II. früh gesammelt. Vol.: 2,9 l.

D des Harnes = 1,054 bei 8°, N = 46,61 im Liter.
Zu jeder Bestimmung wurden 300 ccm verwendet.

a) $b_1 = 0{,}4048$ $b_2 = 0{,}3040$.

Kresol: 0,1362 g, Phenol: 0,0402 g in 300 ccm Harn.
Phenol: 22,8 % der Gesamtphenole.

b) $b_1 = 0{,}4131$ $b_2 = 0{,}3183$.

Kresol: 0,1282 g, Phenol: 0,0504 g in 300 ccm Harn.
Phenol: 28,2 % der Gesamtphenole.

Gesamtphenole als Mittel der beiden Bestimmungen in 300 ccm 0,1775 g; in 2,9 l = 1,716 g = 36 % des verfütterten Kresols.

F. Zwischenperiode.

D des Harnes = 1,035 bei 18°, N = 35,66 g im Liter.

$b_1 = 0{,}0206$ $b_2 = 0{,}0152$

Kresol: 0,0074 g, Phenol: 0,0018 g in 500 ccm Harn.

G. Vierte Fütterungsperiode.

Vom 4. bis 9. III. 1912 inkl. täglich 0,8 g p-Kresol + 0,8 g Natriumbicarbonat. Harn gesammelt vom 4. bis 11. III. früh. Vol.: 3,6 l.

D = 1,042 bei 16°, N = 42,28 g im Liter.

Zu jeder Bestimmung 300 ccm Harn verwendet.

a) $b_1 = 0{,}3439$ $b_2 = 0{,}2666.$

Kresol: 0,1046 g, Phenol: 0,0440 g in 300 ccm Harn.

Phenol: 29,6% der Gesamtphenole.

b) $b_1 = 0{,}3554$ $b_2 = 0{,}2801.$

Kresol: 0,1018 g, Phenol: 0,0508 g in 300 ccm Harn.

Phenol: 33,3% der Gesamtphenole.

Gesamtphenole aus beiden Bestimmungen im Mittel in 300 ccm Harn 0,1506, in 3,6 l = 1,81 g = 38% des verfütterten Kresols.

Verfütterung von Paroxybenzoesäure.

Derselbe Hund wie zur zweiten Versuchsreihe verwendet.

A. Vorperiode.

D des Harnes = 1,037 bei 24°.

Angewandt: 1,5 l Harn.

$b_1 = 0{,}0227$ $b_2 = 0{,}0203.$

Kresol: 0,0032 g, Phenol: 0,0060 g in 1,5 l Harn.

B. Fütterungsperiode.

Die Paroxybenzoesäure ‚Kahlbaum‘ schmolz bei 132°.

Vom 26. bis 29. VII. 1912 inkl. wurde je 1 g Paroxybenzoesäure täglich verfüttert. Der Harn wurde bis 30. VII. früh gesammelt. Vol.: 3 l.

D des Harnes = 1,032 bei 24°.

Angewandt: 300 ccm Harn.

a) $b_1 = 0{,}0093$ $b_2 = 0{,}0084.$

Kresol: 0,0006 g, Phenol: 0,0014 g in 150 ccm Harn.

b) $b_1 = 0,0168$ $b_2 = 0,0141$.

Kresol: 0,0018 g, Phenol: 0,0017 g in 150 ccm Harn.

Phenol in 3 l Harn: 0,030 g = 0,75% der verfütterten Paroxybenzoesäure. Hiervon ist noch die geringe Menge des in der Vorperiode gefundenen Phenols abzuziehen.

Methodisches.

I. Neue Versuche über die b_1-Methode.

Bei der b_1-Methode, dem ersten Teile unserer Methode zur getrennten Bestimmung von p-Kresol und Phenol im Harn. werden Kresol und Phenol als Tribromderivate abgeschieden, filtriert; im Filtrate wird das überschüssige Brom zurücktitriert. Nach Zusatz der entsprechenden Menge Bromlauge läßt man die Mischung gut verschlossen unter öfterem kräftigem Schütteln 1 Stunde lang stehen. Dies ist die von uns ausprobierte und bei der Veröffentlichung unserer Methode gegebene Vorschrift[1]). Das Schütteln hat den Zweck, den Niederschlag für das nachfolgende Filtrieren geeigneter zu machen. Nun kann man natürlich verschieden kräftig schütteln, auch verschieden lange; schließlich hängt die Wirkung des Schüttelns auch von der Gestalt und Größe der verwendeten Gefäße ab. Je nach der subjektiven Art des Schüttelns wird die Korngröße des Niederschlages eine verschiedene werden; bei sehr kräftigem Schütteln besteht die Gefahr, daß sich der Niederschlag zusammenballt, daß er adsorbiertes Brom in wesentlichen Mengen einschließt und dann auch beim Auswaschen mit Wasser nicht wieder abgibt. Man würde dann im Filtrate des Tribrom-Kresol-Phenol-Niederschlages zu wenig Brom finden, wodurch der Wert für b_1 zu hoch gefunden würde.

Wir haben tatsächlich, wenn wir ganz besonders kräftig schüttelten, zu hohe Werte für b_1 erhalten, so in folgenden Versuchen.

Verwendet wurde eine Lösung von Phenol, die im Liter 3,3 g Phenol und eine p-Kresollösung, die im Liter 4,19 g Kresol enthielt. Dargestellt und kontrolliert waren die Lösungen wie früher angegeben.

---

[1]) M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. 29, 386, 1910.

Versuch 1.

Angewandt 10 ccm Phenollösung und 10 ccm Kresollösung.

b_1 gef.: 0,3607, ber.: 0,3543 g; Differenz: 0,0064 = 1,8 %.

Versuch 2.

5 ccm Kresollösung und 5 ccm Phenollösung.

b_1 gef.: 0,1987, ber.: 0,1772; Differenz: 0,0215 = 12,1 %.

Wir haben darauf versucht, die Art des Schüttelns so zu fixieren, daß jeder, der mit der Methode arbeitet, ein zu kräftiges Schütteln vermeiden muß, wenn er unsere Vorschriften befolgt, sind aber zu keinem befriedigenden Resultate gelangt. Schließlich ergab sich, daß man ebenso gute Resultate wie nach der von uns früher gegebenen Vorschrift — bei der von uns geübten Art des Schüttelns — erhält, wenn man während des einstündigen Stehenlassens nach Zusatz der Bromlauge überhaupt nicht schüttelt, sondern nur einmal vor dem Filtrieren durchschüttelt.

Folgende Parallelversuche beweisen dies und zeigen, daß man, wenn man ganz besonders kräftig während des einstündigen Stehenlassens wiederholt durchschüttelt, zu hohe Werte für b_1 erhält.

Versuch 1.

10 ccm Kresollösung, 10 ccm Phenollösung.

A. Wiederholt sehr stark geschüttelt.

b_1 gef.: 0,3667, ber.: 0,3543; Differenz: 0,0124 = + 3,5 %.

B. Nur kurz vor dem Filtrieren einmal geschüttelt.

b_1 gef.: 0,3595, ber.: 0,3543; Differenz: + 0,0052 = + 1,5 %.

C. Ebenso wie B.

b_1 gef.: 0,3527, ber.: 0,3543; Differenz: — 0,0016 = — 0,5 %.

D. Ebenso wie B.

b_1 gef.: 0,3533, ber.: 0,3543; Differenz: — 0,0010 = — 0,3 %.

Versuch 2.

5 ccm Kresollösung und 5 ccm Phenollösung.

A. Wiederholt stark geschüttelt.

b_1 gef.: 0,1888, ber.: 0,1772; Differenz: + 0,0116 = + 6,5 %.

B Ebenso.

b_1 gef.: 0,1916, ber.: 0,1772; Differenz: + 0,0144 = + 8,1 %.

C. Nur einmal kurz vor dem Filtrieren geschüttelt.

b_1 gef.: 0,1808, ber.: 0,1772; Differenz: + 0,0036 = + 2,0%.

D. Nur einmal kurz vor dem Filtrieren geschüttelt.

b_1 gef.: 0,1767, ber.: 0,1772; Differenz: — 0,0005 = — 0,3%.

Da man also bei sehr starkem, wiederholtem Schütteln zu hohe Werte für b_1 erhält, bei ruhigem Stehenlassen und nur einmaligem Durchschütteln vor dem Filtrieren befriedigende, empfehlen wir den Satz S. 386 unserer zitierten Abhandlung: „Dann läßt man noch den 8. Teil der angewandten Menge Bromlauge hinzufließen und läßt die Mischung unter öfterem kräftigen Schütteln 1 Stunde lang stehen" zu ändern in:

Dann läßt man noch den 8. Teil der angewandten Menge Bromlauge hinzufließen und läßt die Mischung gut verschlossen 1 Stunde lang stehen. Kurz vor dem Filtrieren wird einmal durchgeschüttelt.

II. Über den Zusatz von Natronlauge vor dem Eindampfen des Harns bei Bestimmungen der Harnphenole.

Bei den Bestimmungen der Phenole wird zunächst der Harn auf dem Wasserbade eingeengt, um ihn zu konzentrieren und flüchtige Bestandteile, die mit Brom reagieren, zu entfernen. Allgemein findet sich in der Literatur die Angabe, man solle den Harn vor dem Eindampfen bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Natronlauge versetzen, und zwar, um das Entweichen der Phenole mit den Wasserdämpfen zu vermeiden. Auch wir haben diese Angabe gemacht, als wir die ersten Bestimmungen des Kresols und Phenols getrennt im menschlichen Harn mitteilten[1]). Wir erhielten nun bei weiteren Untersuchungen wiederholt ganz herausfallende, sehr niedrige Werte, die von den Resultaten der Parallelbestimmungen weit abwichen. Bei Aufsuchung des Grundes der Fehlresultate konnten wir nicht finden, daß wir Abweichungen von der Vorschrift gemacht hatten, wohl aber, daß wir eine Vorschrift gar zu genau befolgt hatten, daß wir eben nur bis zur schwach alkalischen Reaktion Natronlauge vor dem Eindampfen des Harnes hinzugefügt hatten. Wie die folgenden Versuche zeigen,

[1]) Diese Zeitschr. 34, 469, 1911.

ist ein wesentlicher Überschuß von Natronlauge notwendig, um das Entweichen von Phenolen zu verhindern. Es ist dies von uns auch in den früheren Versuchen bei der getrennten Bestimmung von Kresol und Phenol geschehen und zweifelsohne auch von den früheren Untersuchern, die die Gesamtphenole bestimmt haben, denn sonst hätten sie nicht die Werte erhalten können, die sie erhalten haben. Daß ein erheblicher Überschuß von Natronlauge notwendig ist, ist klar, denn schon eine reine Phenollösung, die nur eben bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Natronlauge vermischt ist, läßt beim Eindampfen Phenol entweichen, da das Phenolnatrium ein sehr stark hydrolysiertes Salz ist und daher die Hydrolyse nur durch einen großen Überschuß von Natronlauge zurückgedrängt werden kann. Solange aber dies nicht geschehen ist, ist freies Phenol in der Lösung vorhanden und entweicht mit den Wasserdämpfen. Beim Harne ist ein noch größerer Überschuß von Natronlauge notwendig, da zunächst Ammoniak durch Natronlauge in Freiheit gesetzt wird unter Bindung von Natronhydrat. Phenolammoniak ist aber noch viel stärker hydrolysiert als Phenolnatrium und vollständig, natürlich auch bei beliebigem Überschusse von Ammoniak, flüchtig, da das Ammoniak selbst flüchtig ist. Hierzu kommt noch die Zersetzung von Harnstoff während des Eindampfens des alkalischen Harns, wodurch Natronhydrat in Natriumcarbonat übergeführt wird, das sich mit Phenolen nicht verbindet.

Der Überschuß von Natronlauge wäre nicht erforderlich, wenn die Phenol- bzw. Kresolätherschwefelsäuren und Glucuronsäuren beim Eindampfen der schwach alkalischen Lösungen keine Spaltung erführen. Dieselbe erfolgt hierbei jedoch wenigstens bis zu einem gewissen Grade. Andernfalls könnte man den Harn ohne jeden Zusatz von Natronlauge eindampfen, was auch von einigen Autoren geschehen ist, nach unseren Erfahrungen jedoch einen Verlust von Phenolen bedingt.

In der folgenden Versuchsreihe wurden von demselben Harn (20 l Studentenharn in einem Gefäße gemischt) teils Bestimmungen ausgeführt, bei denen der Harn vor dem Eindampfen eben schwach alkalisch gemacht, teils Bestimmungen, bei denen 3 l mit 50 g Natronhydrat (mit Alkohol gereinigtes Kahlbaum) versetzt wurde.

1. Angewandt 3 l, eben nur alkalisch gemacht.

$b_1 = 0{,}1953$ $b_2 = 0{,}1392$.

Kresol: 0,0379 g, Phenol: 0,0053 g; Ges.-Phenole: 0,0432 g in 1,5 l Harn.

2. Ebenso wie 1.

$b_1 = 0{,}1737$ $b_2 = 0{,}1226$.

Kresol: 0,0345 g, Phenol: 0,0040 g; Ges.-Phenole: 0,0385 g in 1,5 l Harn.

3. 3 l Harn mit 50 g Natronhydrat eingedampft.

$b_1 = 0{,}2532$ $b_2 = 0{,}2055$.

Kresol: 0,0322 g, Phenol: 0,0216 g; Ges.-Phenole: 0,0538 g in 1,5 l Harn.

4. Ebenso wie 3.

$b_1 = 0{,}2650$ $b_2 = 0{,}2176$.

Kresol: 0,0320 g, Phenol: 0,0241 g; Ges.-Phenole: 0,0561 g in 1,5 l Harn.

Man sieht, daß bei Zusatz von Natronlauge nur bis zur schwach alkalischen Reaktion weit weniger Gesamtphenole erhalten wurden als nach Zusatz von 50 g Natronhydrat. Im Mittel wurden für diese in 1. und 2. 0,0409 g gefunden, im Mittel bei 3. und 4. 0,0550 g. Vor allem sind im ersteren Falle die Phenolmengen viel geringer als im zweiten Falle; sie betragen im Mittel 0,0047 g gegen 0,0229 g. Die relativen Mengen Phenol von den Gesamtphenolen sind im ersten Falle 11,5%, im letzteren 41,7%. Die erstere Zahl fällt ganz aus den früher (l. c. S. 471) erhaltenen Werten heraus, die letztere stimmt mit dem Durchschnitte dieser Werte überein.

Als ersten Grund für die relativ kleinen Phenolmengen bei der Arbeitsweise der Versuche 1 und 2 ist die leichtere Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen des Phenols gegenüber der des Kresols anzusehen, als zweiter könnte eine leichtere Zersetzlichkeit der Phenolätherschwefelsäure und Phenolglucuronsäure gegenüber der der entsprechenden Verbindungen des Kresols in Betracht kommen.

In folgenden Versuchen wurden von einer neugesammelten Harnmenge, ebenfalls gemischter Studentenharn, je 3 l mit 100 g Ätznatron eingedampft und auch hier eine den früher ge-

fundenen Werten entsprechende prozentuarische Phenolmenge erhalten.

1. $b_1 = 0,2952$ $b_2 = 0,2432$.

Kresol: 0,0352 g, Phenol: 0,0273 g; Ges.-Phenole: 0,0625 g in 1,5 l Harn.

2. $b_1 = 0,2761$ $b_2 = 0,2272$.

Kresol: 0,0331 g, Phenol: 0,0254 g; Ges.-Phenole: 0,0585 g in 1,5 l Harn.

Im Mittel wurden also 43,5 °/₀ Phenol der Ges.-Phenole gefunden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob etwa bei Zusatz einer wesentlich größeren Menge Natronhydrat (250 g auf 3 l) andere Resultate als bei Zusatz von 100 g Natronhydrat erhalten werden.

Verwendet wurde wieder neu gesammelter, gemischter Studentenharn.

1. Auf 3 l Harn 100 g Natronhydrat verwendet.

$b_1 = 0,2695$ $b_2 = 0,2070$.

Kresol: 0,0423 g, Phenol: 0,0161 g; Ges.-Phenole: 0,0584 g in 1,5 l Harn.

2. Auf 3 l Harn 250 g Natronhydrat verwendet.

$b_1 = 0,2815$ $b_2 = 0,2184$.

Kresol: 0,0427 g, Phenol: 0,0181 g; Ges.-Phenole: 0,0608 g in 1,5 l Harn.

3. Auf 3 l Harn 250 g Natronhydrat verwendet.

$b_1 = 0,2673$ $b_2 = 0,2081$.

Kresol: 0,0400 g, Phenol: 0,0176 g; Ges.-Phenole: 0,0576 g in 1,5 l Harn.

Der größere Zusatz von Natronhydrat hat also kein anderes Resultat ergeben als der von 100 g.

Die Phenolmengen betrugen hier 29,4 °/₀ der Gesamtphenole, also weniger als wir bisher für gemischten Harn meist gefunden hatten. Nur in einem Harn (l. c.) hatten wir ungefähr ebensoviel (28,8 °/₀) gefunden.

Nach unseren Erfahrungen hat man also 100 g Ätznatron oder mehr auf 3 l Harn vor dem Einengen hinzuzufügen.

Über den Einfluß der Osmiumsäure auf den Receptorenapparat der Erythrocyten.

Von

Felix Rosenthal.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin und der Medizinischen Klinik der Universität Breslau.[1])]

(Eingegangen am 2. September 1912.)

In früheren Untersuchungen, die an das zuerst von Morgenroth[2]) beschriebene Phänomen des Amboceptorüberganges anknüpfen, haben Morgenroth und ich[3]) dieses Phänomen unter den verschiedensten Bedingungen, wie sie sich durch Variation der bei der Reaktion beteiligten Komponenten ergeben, einer eingehenden Analyse unterzogen. Wir haben zunächst in mannigfach abgeänderten Versuchen gezeigt, daß neben den Faktoren der Zeit, der Temperatur und der Beschaffenheit des Mediums, die von Philosophow[4]) unter Morgenroths Leitung eingehend studiert worden sind, für die Reversibilität der Amboceptor-Erythrocyten-Verbindung auch besondere Zustandsformen der reagierenden Komponenten, die wir kurz mit dem Begriff der Avidität charakterisiert haben, von wesentlicher Bedeutung sind. Wir berichteten weiter über die Bedingungen des Amboceptorüberganges unter den komplizierten Verhältnissen, die

[1]) Die Kosten der Versuche, soweit sie im Berliner Pathologischen Institut ausgeführt sind, wurden von den Herrn Prof. Morgenroth aus der Stiftung der Gräfin Luise Bose bewilligten Mitteln bestritten.

[2]) Morgenroth, Münch. med. Wochenschr. **1908**, Nr. 2.

[3]) Morgenroth und Rosenthal, I. Mitteilung: Diese Zeitschr. **36**, Heft 2 bis 4, S. 190; II. Mitteilung: Diese Zeitschr. **39**, Heft 1 bis 2, S. 88.

[4]) Philosophow, diese Zeitschr. **20**, 292, 1909.

bei Erythrocyten und anderen Zellen verschiedener Spezies und bei verschiedenartigen Zellen ein und derselben Tierart vorliegen. In hieran sich anschließenden Experimenten habe ich[1]) mich dann mit dem Übergang des durch Spermatozoeninjektionen erzeugten hämolytischen Amboceptors von Erythrocyten, Spermatozoen und Leberzellen auf Erythrocyten der gleichen Spezies beschäftigt und hierbei gezeigt, daß zwischen der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera und dem in der üblichen Weise durch Blutbehandlung gewonnenen hämolytischen Amboceptor trotz zahlreicher Wesensgemeinschaften doch Differenzen bestehen, die auf eine verschiedene Konstitution der beiden Immunkörper hinweisen.

Aus allen diesen Untersuchungen ging hervor, daß für den Übergang der Amboceptoren das Verhältnis der Aviditäten von abgebenden und empfangenden Zellelementen von maßgebender Bedeutung ist. Je geringer die Avidität des hämolytischen Amboceptors zu der abgebenden Zellart, und je größer sie zu den empfangenden Blutkörperchen ist, desto leichter erfolgt der Amboceptorübergang. Unter diesem Gesichtspunkte konkurrierender Aviditäten konnten die Phänomene des Amboceptorüberganges von Blut zu Blut und die Modalitäten des Amboceptoraustausches zwischen Organzellen und Blut, die durch bestimmte Differenzen gegenüber dem Amboceptorübergang von Blut zu Blut charakterisiert sind, einem Verständnis entgegengeführt werden.

Dieses Spiel der Aviditäten, die für das Maß und die Richtung des Amboceptorüberganges von entscheidendem Einflusse sind, darf, wie bereits früher ausgeführt worden ist, auch über die serologische Betrachtungsweise hinaus ein weitergehendes Interesse beanspruchen. Bekanntlich ist Ehrlich[2]), einer Anschauung von Miescher folgend, der Ansicht, daß die Erythrocyten nicht nur Träger des Sauerstoffes für den Bedarf der Gewebe, sondern überhaupt Speicherungszentren darstellen, daß sie aus dem Plasma Substanzen in sich aufnehmen,

[1]) Rosenthal, diese Zeitschr. 42, Heft 1, 1912.

[2]) P. Ehrlich, Spezielle Pathologie und Therapie von Nothnagel, Bd. 8: Leukämie. Schlußbetrachtungen. S. 163 bis 185.

sie durch die Gewebe tragen und denjenigen Zellen übermitteln, die im jeweiligen Moment dieselben benötigen. Wenn diese Anschauungen Ehrlich's den Tatsachen entsprechen, wenn die Receptoren der Zellen zur Aufnahme von Nahrungsstoffen dienen, und wenn die Blutkörperchen mit ihrem Receptorenapparat hierbei als Vermittler dienen, dann dürften die Phänomene des Amboceptorüberganges gleichsam ein Bild von Resorptions-, Eliminations- und Austauschprozessen im zellulären Stoffwechsel geben. Denn ebenso wie der Übergang des Amboceptors von Blutkörperchen zu Blutkörperchen, von Organzellen auf Blutkörperchen sich vollzieht, können diejenigen Substanzen, deren Aufnahme die Receptoren physiologischerweise dienen, aufgenommen werden. So kann in Analogie zum Amboceptorübergang ein Austausch von Blutkörperchen zu Blutkörperchen in der Zirkulation, ein Übergang von den Blutkörperchen auf die Zellen der Capillarwände und von diesen eine Abgabe des betreffenden Nährstoffes an die ihn beanspruchenden Organzellen stattfinden.

Es müßten demnach Richtung und Maß dieser Übergänge bestimmt werden durch die Aviditäten, deren Wirken wir bei den Beziehungen der Amboceptoren zu Receptoren kennen gelernt haben.

In Konsequenz dieser Anschauungen ist nun im Hinblick auf zahlreiche Erscheinungen des physiologischen und pathologischen Stoffwechsels wohl die Annahme berechtigt, daß der Aviditätsgrad der Zellreceptoren zu bestimmten Substanzen keine Konstante darstellt, sondern je nach den Nahrungsbedürfnissen und dem Zustande der Zelle in weiten Grenzen schwanken kann.

Es ist nun selbstverständlich nicht notwendig, daß jede Zustandsänderung der Zellen ihren Ausschlag in einer Aviditätsänderung der Receptoren gegenüber bestimmten Stoffen finden muß. Immerhin ist es klar, daß, wenn im Sinne der Ehrlich'schen Anschauungen die Receptoren diejenigen Apparate darstellen, deren Intaktheit zum wesentlichen Teile den normalen Rhythmus des physiologischen Geschehens in der Zelle garantiert, eine einigermaßen beträchtliche Schädigung dieser Receptoren zu einer Störung des Stoffwechsels der Zelle führen muß.

Eine Substanz nun, welche die antikörperauslösenden Eigenschaften der roten Blutkörperchen zu zerstören, mit anderen Worten den Receptorenapparat der Erythrocyten zu schädigen vermag, stellt nach den Untersuchungen von Coca die Osmiumsäure dar.

Coca[1]) wies nämlich nach, daß stark osmierte Rinderblutkörperchen nicht mehr befähigt sind, Amboceptoren immunisatorisch auszulösen, aber noch bindungsfähig für hämolytische Amboceptoren bleiben. A. von Szily[2]), der unter Leitung von H. Sachs diese Resultate einer Nachprüfung unterzog, gelangte zu einer vollständigen Bestätigung der Coca'schen Ergebnisse und ergänzte sie gleichzeitig durch den für das Verständnis der Osmiumwirkung wichtigen Befund, daß osmiertes Meerschweinchenblut Rinderblutamboceptoren, also heterologe hämolytische Immunkörper, oft in beträchtlichem Maße, zu absorbieren vermag, während normales Meerschweinchenblut dieselben vollständig intakt läßt, Befunde, die auch von Busson[3]) bestätigt worden sind. Die Behandlung der roten Blutkörperchen mit Osmiumsäure verleiht somit den Blutzellen neue Qualitäten, die einmal durch die Aufhebung der die Antikörperbildung auslösenden Funktion und ferner durch ein Bindungsvermögen der osmierten Erythrocyten für heterologe hämolytische Amboceptoren sich charakterisieren. Ob die durch zahlreiche Experimente gestützte Annahme v. Szily's, daß es sich bei der Amboceptorverankerung osmierter Erythrocyten nicht um eine spezifische Bindung, sondern um ein Adsorptionsphänomen handle, nun den Tatsachen entspricht, oder ob nicht die der Betrachtung zunächst fernliegende Möglichkeit zu erwägen ist, daß unter dem Einflusse der Osmiumwirkung normalerweise latent vorhandene spezifische Receptorengruppen in Aktion treten, wird noch zu diskutieren sein.

Haben wir in den vorangehenden Mitteilungen den Amboceptoraustausch zwischen nicht geschädigten Zellen zum Gegenstand der experimentellen Untersuchung gemacht, so versuchen die folgenden Experimente auf der so gewonnenen Grundlage einen Einblick in die entsprechenden Prozesse bei mit Osmiumsäure behandelten Zellen zu verschaffen.

Zur Technik unserer Versuche haben wir vorauszuschicken: Die Behandlung der roten Blutkörperchen mit Osmiumsäure geschah nach der von Coca angegebenen Vorschrift[4]).

Beim hämolytischen System diente das inaktivierte Serum von mit Hammelblut vorbehandelten Kaninchen als Amboceptor, Meer-

[1]) Coca, diese Zeitschr. 14, 125.
[2]) v. Szily, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 8, 451.
[3]) Busson, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 11, Heft 5, 1911.
[4]) l. c.

schweinchenserum als Komplement. Die Aufzeichnung der eingetretenen Hämolyse erfolgte nach 2stündigem Stehen bei 37° und etwa 18 bis 20stündigem Aufenthalt im Eisschrank. Die Versuchsanordnung blieb im übrigen die gleiche wie die der früheren Übergangsversuche.

Die Beurteilung der Hämolyse wird dadurch einigermaßen erschwert, daß die mit Osmiumsäure behandelten Erythrocyten im komplementhaltigen Medium trotz Anwesenheit spezifischer hämolytischer Amboceptoren einer Hämolyse nicht unterliegen. Man sieht nach Beendigung der Versuche am Boden der Reagensgläschen ein schwärzliches, klebriges Sediment von osmierten Erythrocyten, das gleichzeitig ev. sedimentierte ungelöste, normale rote Blutkörperchen enthalten kann und damit die Feststellung des Hämolysegrades durch die Abschätzung der Menge ungelöster normaler Erythocyten unmöglich macht. Man ist somit zur Beurteilung der Hämolyse ausschließlich auf vergleichende colorimetrische Messungen angewiesen.

Als ein für die experimentellen Ergebnisse wesentliches Moment ist noch hervorzuheben, daß die Versuchsröhrchen während ihres Aufenthaltes im Wasserbade bei 40°, währenddessen der Amboceptorübergang erfolgt, häufig und stark geschüttelt werden müssen, da die osmierten Blutkörperchen rasch sedimentieren und sich alsdann infolge des mangelhaften Kontaktes der normalen Erythrocyten mit den osmierten, amboceptorbeladenen roten Blutzellen der Amboceptoraustausch nur unvollständig vollzieht.

Wir betrachten im folgenden zunächst den

A. Übergang hämolytischer Amboceptoren von mit Osmiumsäure behandelten Erythrocyten auf normale homologe Erythrocyten.

Bezüglich des Überganges von Amboceptor zwischen artgleichen, normalen roten Blutkörperchen hatte bereits Philosophow[1]) bei Versuchen, die unter Morgenroth's Leitung ausgeführt wurden, in Übereinstimmung mit früheren Angaben von Muir[2]) gefunden, daß von den abgebenden Blutkörperchen sechs Amboceptoreinheiten gebunden sein müssen, wenn an die neu zugefügte gleiche Menge von Erythrocyten eine volle Amboceptoreinheit abgegeben werden soll. Auch nach den in der I. Mitteilung von Morgenroth und Rosenthal wiedergegebenen Erfahrungen muß angenommen werden, daß bei den meisten Amboceptoren die Bindung von sechs Amboceptoreinheiten die

---

1) Philosophow, l. c.

2) Muir, On the act. of haemolytic. sera. Lancet 1903, II, S. 446. — Discuss. on immunity. Brit. med. Journ. 1904, 577.

Voraussetzung für den Übergang einer Amboceptoreinheit bildet. Immerhin konnten wir dort zeigen, daß dieser Fall keinen gesetzmäßigen Grenzfall weder nach der einen noch nach der anderen Richtung darstellt, und daß auch bei Bindung von 12 Amboceptoreinheiten der Übergang einer Amboceptoreinheit ausbleiben kann, andererseits unter Umständen bereits bei Bindung von 3 und sogar 2 Einheiten der Übergang einer Einheit auf die frisch hinzugefügten homologen Blutkörperchen erfolgt. Derartige Amboceptorentypen kamen auch in den folgenden Versuchen zur Verwendung, in denen zu gleicher Zeit unter durchaus gleichartigen Bedingungen der Übergang des hämolytischen Amboceptors von normalen auf normale Blutkörperchen und von osmierten auf normale Erythrocyten zur Beobachtung gelangte.

Wir geben von unseren Versuchen folgende Beispiele in Tabelle Ia und Ib wieder.

Wenn wir die Resultate dieser Versuche überblicken, so geht aus ihnen hervor, daß die Verbindung zwischen hämolytischem Amboceptor und osmierten roten Blutkörperchen reversibel ist. Im allgemeinen vollzieht sich dieser Übergang des Amboceptors von osmierten auf normale, artgleiche Erythrocyten unter den gleichen Gesetzmäßigkeiten, wie der Amboceptoraustausch zwischen normalen homologen roten Blutkörperchen. Nur in den in den Tabellen zuletzt angeführten zwei Versuchen erscheint der Amboceptorübergang zwischen normalen Erythrocyten gegenüber dem Amboceptoraustausch zwischen osmiertem und nativem Blut erleichtert, da bereits bei ursprünglicher Bindung von 5, bzw. 6 Amboceptoreinheiten der Übergang einer Einheit von normalen auf normale Hammelblutkörperchen erfolgt, während erst bei Darbietung von neun Amboceptoreinheiten, von denen ca. acht beansprucht sein dürften, bei Verwendung osmierter Blutkörperchen der Übergang einer Einheit auf normale Erythrocyten eintritt. In dem einen Versuch 3 ist selbst diese ursprünglich gebundene Amboceptormenge nicht ausreichend, um den Übergang einer ganzen Amboceptoreinheit von osmierten auf native Hammelblutkörperchen zu ermöglichen. Immerhin stehen derartige Beobachtungen unter der großen Zahl unserer in dieser Richtung unter-

Tabelle Ia.

Übergang der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von normalen Hammelblutkörperchen auf normale Hammel-Erythrocyten.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Hammelblut	Versuch	Normale Hammelblutkörperchen										
			bei Darbietung von Hammelblut-Kan.-Amboceptor binden von										geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von
			1 l. D.	3 l. D.	4 l. D.	5 l. D.	6 l. D.	7 l. D.	8 l. D.	9 l. D.	10 l. D.	12 l. D.	
2. I. 1912	0,0002	1	1	3	—	—	6	—	8	—	—	—	6 Einheiten
16. XI. 1911	0,009	2	1	3	—	5	—	7	—	—	10	—	10 Einheiten
22. IV. 1911	0,004	3	—	3	—	5	6	7	—	9	—	11	5 Einheiten
25. XI. 1911	0,003	4	—	—	4	—	6	—	8	—	10	—	6 Einheiten

Tabelle Ib.

Übergang der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von mit Osmiumsäure behandelten Hammelblutkörperchen auf normale Hammelblutkörperchen.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Hammelblut	Versuch	Osmierte Hammelblutkörperchen										
			bei Darbietung von Hammelblut-Kan.-Amboceptor binden von										geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von
			1 l. D.	3 l. D.	4 l. D.	5 l. D.	6 l. D.	7 l. D.	8 l. D.	9 l. D.	10 l. D.	12 l. D.	
2. I. 1912	0,0002	1	1	3	—	—	6	—	8	—	—	—	6 Einheiten
16. XI. 1911	0,009	2	1	3	—	5	—	7	—	—	10	—	10 Einheiten
22. IV. 1911	0,004	3	—	3	—	< 5	> 5	6	—	> 8	—	10	Mehr als 8 Einheiten
25. XI. 1911	0,003	4	—	—	4	—	6	—	8	—	10	—	8 Einheiten

nommenen Versuche relativ vereinzelt da. Erscheint somit auf Grund der eben besprochenen Versuche der Prozeß der Bindung des homologen Amboceptors an osmierte Erythrocyten und dessen Abgabe an artgleiche native rote Blutkörperchen im allgemeinen nicht wesentlich verschieden von den analogen Vorgängen bei Verwendung homologer Erythrocyten als abgebende und empfangende Elemente, so zeigen doch die folgenden Experimente, daß trotz der scheinbaren Analogien die Art der Bindung zwischen osmierten Erythrocyten und Amboceptor eine andere ist, als die zwischen den Receptoren nativer Blutkörperchen und ihren spezifischen hämolytischen Immunkörpern.

B. Übergang hämolytischer Amboceptoren von mit Osmiumsäure behandelten Erythrocyten auf normale heterologe Erythrocyten.

In einer früheren Mitteilung haben Morgenroth und Rosenthal in Bestätigung der Philosophowschen Ergebnisse gezeigt, daß wohl gesetzmäßig von homologem auf heterologes Blut ein Amboceptorübergang nicht stattfindet. Aus dem Ausbleiben des Amboceptorüberganges unter diesen Bedingungen ergab sich mit Notwendigkeit der Schluß, daß die Avidität der Amboceptoren den homologen Blutkörperchen gegenüber eine weit erheblichere ist wie gegenüber heterologen, und daß die Avidität der Rinderblut- und Hammelblutreceptoren zum heterologen Amboceptor nicht ausreicht, um die Verbindung der homologen Komponenten, der Erythrocyten und ihrer spezifischen Kan.-Amboceptoren, zu sprengen.

Über die Verhältnisse, wie sie beim Übergang des Amboceptors von homologen, mit Osmiumsäure behandelten Erythrocyten auf heterologe normale Blutkörperchen vorliegen, geben die folgenden Versuche Aufschluß:

Versuch 5.

(10. I. 1912.)

Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von osmiertem Hammelblut auf normales Rd.-Blut.

5% osmiertes Hammelblut (nach Coca) vom 9. I. 1912.
Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom 4. I. 1912 (H. J. 3).

Lösende Dosis für Rd.-Blut: $0{,}35\,{}^{1}/_{10}$.
M.-S. vom 10. I. 1912.
Je 1 ccm osmiertes Hammelblut.
Gesamtvolumen 2 ccm.

Mengen des Hammelblut-Kan.-Amboceptors	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,18	5
2. 0,35	10
3. 0,53	15
4. 0,7	20

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Normales Rd.-Blut ccm	M.-S. ccm	Hämolyse bei Darbietung von 5 l. D.	10 l. D.	15 l. D.	20 l. D.
1,0	1,0	0,1	0	—	—	—
0,4	1,0	0,1	0	mäßig	stark	komplett
0,2	1,0	0,1	—	schwach	mäßig	stark—mäßig
0,1	1,0	0,1	—	—	—	schwach

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse	Ohne Kompl. Hämolyse:
1	5	stark — f. kompl.	0
2	10	kompl.	
3	15	„	
4	20	„	

Kontrollen.

Osmiertes Hammelblut	+	Normales Rd.-Blut	+ Kompl.	Hämolyse
0,5 ccm		0,5 ccm	0,1	f. 0
— „		0,5 „	0,1	f. 0
0,5 „	+	0,5 „ 1 × sens.	0,1	kompl.

Versuch 6.

(9. I. 1912.)

Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von osmiertem Hammelblut auf normales Rd.-Blut.

5% osmiertes Hammelblut (nach Coca) vom 9. I. 1912.
Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom 6. I. 1912 (H. J. 2).
Lösende Dosis für Rd.-Blut: $0{,}2\,{}^{1}/_{100}$.

M.-S. vom 9. I. 1912.
Je 1 ccm osmiertes Hammelblut.
Gesamtvolumen 2 ccm.

Mengen des Hammelblut-Kan.-Amboceptors	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,1 $^1/_{10}$	5
2. 0,2 $^1/_{10}$	10
3. 0,3 $^1/_{10}$	15
4. 0,4 $^1/_{10}$	20

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Normales Rd.-Blut ccm	M.-S. ccm	Hämolyse bei Darbietung von 5 l. D.	10 l. D.	15 l. D.	20 l. D.
1,0	1,0	0,1	—	—	—	—
0,5	1,0	0,1	mäßig	—	kompl.	kompl.
0,2	1,0	0,1	—	mäßig	f. kompl.	—
0,1	1,0	0,1	—	—	—	stark

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse	Ohne Kompl. Hämolyse
1	5	schwach	0
2	10	mäßig—schwach	
3	15	kompl.	
4	20	„	

Weitere Kontrollen wie bei Versuch 5.

Versuch 7.

(22. XII. 1911.)

Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von osmiertem Hammelblut auf normales Rd.-Blut.

5% osmiertes Hammelblut (nach Coca) vom 21. XII. 1911.
Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom 4. XII. 1911 (H. J. 1).
Lösende Dosis für Rd.-Blut: 0,008.
M.-S. vom 21. XII. 1911.
Je 1 ccm osmiertes Hammelblut.
Gesamtvolumen 2 ccm.

Mengen des Hammelblut-Kan.-Amboceptors	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,4 $^1/_{10}$	5
2. 0,8 $^1/_{10}$	10
3. 0,12	15
4. 0,16	20

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Normales Rd.-Blut ccm	M.-S. ccm	Hämolyse bei Darbietung von 5 l. D.	10 l. D.	15 l. D.	20 l. D.
0,8	1,0	0,1	schwach	mäßig	—	—
0,4	1,0	0,1	Spur	schwach	mäßig—stark	stark
0,2	1,0	0,1	—	„	mäßig—schw.	mäßig
0,1	1,0	0,1	—	—	—	schwach

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse	Ohne Komplement
1	5	schwach	0
2	10	mäßig—schwach	0
3	15	kompl.	0
4	20	„	0

Kontrollen wie vorher.

Es steht das Ergebnis dieser Versuche mit sämtlichen Erfahrungen, wie sie beim Übergang des Amboceptors von artgleichen auf heterologe normale Blutkörperchen gemacht werden, im Gegensatz. Es findet nämlich von osmierten homologen Blutzellen ein Übergang des Amboceptors auf die heterologe Blutart statt. So sehen wir in Versuch 5 bei ursprünglicher Bindung von ca. 10 lösenden Dosen an die osmierten Erythrocyten den Übergang einer Amboceptoreinheit auf die heterologen Rinderblutkörperchen sich vollziehen, und in ähnlicher Weise findet in Versuch 6 bei ursprünglicher Bindung von 5 Amboceptoreinheiten nach Darbietung von 15 Amboceptordosen der Übergang einer Einheit auf die heterologe Blutart statt. In Versuch 7 ist das Bindungsvermögen der osmierten Hammelblutkörperchen für die auf Rinderblut wirkende Komponente der Hammelblut-Immunsera ganz besonders stark ausgesprochen. Hier dürften nach dem Ergebnis der Abgußuntersuchung von 15, bzw. 20 lösenden Dosen für Rinderblut ca. 12, bzw. 15 Einheiten von den osmierten Hammelblutzellen gebunden worden sein. Der Übergang einer Amboceptoreinheit auf Rinderblut erfolgt hier bei ursprünglicher Bindung von ungefähr 12 Einheiten durch die mit Osmiumsäure behandelten Hammelerythrocyten.

In der II. Mitteilung haben Morgenroth und ich das Ausbleiben des Amboceptorüberganges von homologem Blut auf heterologes Blut theoretisch so gedeutet, daß die Avidität der heterologen Receptoren viel zu gering ist, um das Reaktionsprodukt der unter starker Avidität sich vereinigenden homologen Receptoren und des homologen Amboceptors zu sprengen. Unter dieser Betrachtungsweise dürfen wir uns daher in den hier vorliegenden Fällen vorstellen, daß der durch Blutbehandlung erzeugte hämolytische Amboceptor offenbar selbst zu den Receptoren der heterologen Blutart weit stärkere chemische Affinitäten besitzt als zu den amboceptorfixierenden Apparaten der mit Osmiumsäure vergifteten homologen Blutzellen, und daß wir hier mit anderen Gesetzmäßigkeiten zu rechnen haben, als wir sie für den Übergang von Amboceptoren von normalem auf normales Blut feststellen konnten. Inwieweit derartige Phänomene unter dem Gesichtspunkte konkurrierender spezifischer Aviditäten ihre Erklärung finden können, wird noch weiter zu erörtern sein.

C. Über das Bindungsvermögen sensibilisierter und nachträglich osmierter Erythrocyten für homologe hämolytische Amboceptoren.

Wir haben an früherer Stelle darauf hingewiesen, daß nach unserer Ansicht das Tatsachenmaterial, das v. Szily zur Stütze seiner Anschauung über das Wesen der Reaktion zwischen osmierten Erythrocyten und hämolytischem Amboceptor heranzieht, nicht ohne weiteres dazu ausreicht, den adsorptiven, unspezifischen Charakter der Verbindung zwischen roten Blutkörperchen und hämolytischen Immunkörpern mit Sicherheit zu erweisen, und daß die der Betrachtung zunächst fernliegende Möglichkeit zu erwägen ist, daß unter dem Einflusse der Osmiumwirkung normalerweise latent vorhandene spezifische Receptorengruppen in Aktion treten, die eine spezifische Amboceptor-Receptor-Bindung bewirken. Daß es sich unter diesem Gesichtspunkte einer spezifischen Bindung zwischen osmierten Erythrocyten und hämolytischem Amboceptor wohl nicht etwa um den Normalreceptoren analog gebaute Apparate

handeln kann, wie sie bei der Bindung des hämolytischen Immunkörpers an normale Blutzellen zur Funktion gelangen, ging schon aus der geschilderten Differenz der Übergangsphänomene hervor, wie sie sich für den Übergang des Amboceptors von normalen homologen und osmierten roten Blutzellen auf heterologe normale Blutkörperchen ergab. Es resultiert dies auch weiter aus dem folgenden Versuch.

Versuch 8.

(9. V. 1911.)

A. 20 ccm dreimal gewaschenes 5%iges Ziegenblut werden mit 0,8 ccm unverdünntem Zg.-Kan.-Amboceptor vom 22. IV. 11 (1 × l. D. 0,002 für Ziegenblut) 1 Stunde bei 37° im Brutschrank digeriert. Von den so den Blutkörperchen pro ccm dargebotenen 20 Amboceptoreinheiten werden 15 Einheiten laut Abgußuntersuchung gebunden. Das so sensibilisierte Blut wird alsdann nach der Cocaschen Vorschrift mit 2%iger Osmiumsäure behandelt.

B. 20 ccm dreimal gewaschenes 5%iges Ziegenblut werden nach der Cocaschen Vorschrift mit 2%iger Osmiumsäure behandelt.

C. 20 ccm 15 fach sensibilisiertes Ziegenblut. Zu je 1 ccm 5%igen Ziegenblut der Reihe A, B, C werden folgende Amboceptormengen hinzugefügt:

Amboceptormengen	Einheiten für Ziegenblut
0,4 $^1/_{100}$	2
0,8 $^1/_{100}$	4
1,2 $^1/_{100}$	6
1,6 $^1/_{100}$	8
0,2 $^1/_{10}$	10
0,3 $^1/_{10}$	15

1 Stunde bei 37°. Dann Abgußuntersuchung.

Blutart	Es binden von 2 l. D.	4 l. D.	6 l. D.	8 l. D.	10 l. D.	15 l. D.
15 fach sensibilisiertes und nachträglich osmiertes Zg.-Blut . .	2	4	6	8	9	14
Osmiertes Zg.-Blut . .	2	4	< 6	< 8	9	12
15 fach sensibilisiertes normales Zg.-Blut .	1	3	5	6	7	9

Es geht aus diesem Versuche hervor, daß **die der Osmierung vorangehende Sensibilisierung der roten Blutkörperchen die Bindungsfähigkeit der osmierten Erythrocyten für homologe Amboceptoren nicht be-**

einträchtigt. Die in den Versuchen A und B bei Darbietung von 15 Amboceptoreinheiten hervortretende Verschiedenheit des Bindungsvermögens ist an sich zu unbedeutend, um weitere Schlußfolgerungen zu rechtfertigen.

Damit ist gezeigt, daß die Bindung hämolytischer Amboceptoren durch osmierte rote Blutkörperchen nicht durch die gleichen Apparate erfolgt, die die Bindung der hämolytischen Immunkörper an normale homologe Blutkörperchen vermitteln, und daß die bindende Substanz der Blutkörperchen in beiden Fällen nicht die gleiche ist.

D. Übergang heterologer hämolytischer Amboceptoren von osmierten Meerschweinchenblutkörperchen auf homologe und heterologe normale Erythrocyten.

Ein Hauptargument für den unspezifischen, adsorptiven Charakter des Reaktionsproduktes zwischen osmierten Erythrocyten und homologen hämolytischen Amboceptoren sieht v. Szily in der Tatsache, die auch wir in vollem Umfange bestätigen können, daß rote Blutkörperchen des Meerschweinchens durch die Behandlung mit Osmiumsäure ein deutliches, oft sogar beträchtliches Bindungsvermögen für Rinderblutamboceptoren, also für heterologe hämolytische Immunkörper, gewinnen. So beweisend auch auf den ersten Blick dieses Phänomen für die Annahme einer unspezifischen Bindungsweise zwischen osmierten Erythrocyten und homologen Amboceptoren erscheinen mag, so mehren sich doch in jüngster Zeit gewisse Beobachtungen, die darauf hinweisen, daß den Bindungsprozessen zwischen osmierten Erythrocyten und homologen Amboceptoren doch vielleicht wohl kompliziertere Vorgänge zugrunde liegen, als sie von v. Szily angenommen werden, und daß wir möglicherweise bei der Verbindung zwischen hämolytischem Amboceptor und osmierten Erythrocyten, ja, auch selbst bei der Fixation heterologer Amboceptoren an osmierte Meerschweinchenblutkörperchen mit der Möglichkeit spezifischer Bindungen zu rechnen haben.

Eine Schwierigkeit steht der Szily'schen Deutung von vornherein entgegen, nämlich die Angabe Coca's, daß osmiertes Kaninchenblut die für Rinderblut spezifischen Amboceptoren

nicht zu binden vermag. Es ist in der Tat schwer verständlich, warum, wenn unter der Einwirkung der Osmiumsäure ein der Spezifität entbehrendes Absorptionsvermögen der Erythrocyten entsteht, dieses bei der Osmierung der roten Blutkörperchen des Kaninchens vermißt werden soll. Auch v. Szily hat diese Schwierigkeit deutlich empfunden, indem er sie mit der Erklärungsmöglichkeit zu umgehen sucht, daß verschiedene Blutarten durch die Osmiumsäure nicht in gleicher Weise alteriert werden, und daß möglicherweise auch geringe Variationen technischer Art und individueller Blutbeschaffenheit Verschiedenheiten der Osmiumsäurewirkung bedingen könnten.

In jüngster Zeit haben nun Forssman[1]) und Morgenroth und Rosenthal[2]) über Versuche mit Meerschweinchenorganzellen berichtet, deren Ergebnisse sich zu einem einheitlichen, auf den ersten Blick paradox erscheinenden Resultat vereinigend, einen Einblick in bisher unbekannte Strukturverhältnisse des Meerschweinchenprotoplasmas gewähren und vielleicht auch dazu berufen sein können, unsere Anschauungen über den Bau der Erythrocyten und der Organzellen im allgemeinen zu beeinflussen. Forssman stellte nämlich fest, daß durch Injektionen von Meerschweinchenorganemulsionen (Leber, Niere, Nebenniere, Hoden, Gehirn), nicht aber von Meerschweinchenblut eine Bildung von spezifischen Hammelbluthämolysinen im Kaninchenorganismus ausgelöst werde, die alle Charakteristika der hämolytischen Amboceptoren besitzen. Sie wurden von Hammelblutkörperchen in spezifischer Weise gebunden, während es nicht gelang, die Immunkörper an Meerschweinchen-, Ochsen- oder Schweineblut zu binden. Bei dem intimen Zusammenhange, wie er im allgemeinen zwischen den die Antikörper bindenden und den dieselben im Organismus auslösenden Komponenten besteht, deren Identität die Ehrlichsche Seitenkettentheorie lehrt, war es nun von vornherein zu erwarten, daß auch die Organzellen des Meerschweinchens das durch ihre Injektion erzeugte Meerschweinchenorganzellen-Hammelbluthämolysin binden würden. Sofern Meerschweinchenniere für die Bindungs-

[1]) Forssman, diese Zeitschr. 37, 1911.
[2]) l. c.

versuche verwendet wurde, wurde in der Tat immer eine Bindung zwischen Hämolysin und Meerschweinchenorgan beobachtet. Andererseits wurden nicht selten Meerschweinchenlebern gefunden, die wohl imstande waren, die Bildung von Hammelbluthämolysinen auszulösen, ohne daß ihnen ein deutliches Bindungsvermögen für das genannte Hämolysin zukam (Forssman).

Ohne auf eine Kritik der Ergebnisse und Argumentationen Forssmans, dessen Hauptbefund prinzipiell wichtig ist, hier näher einzugehen, ist jedenfalls zu sagen, daß Morgenroth und ich in unseren eigenen Versuchen ein konstantes Bindungsvermögen der Meerschweinchenleberzellen für Hammelblut-Kan.-Amboceptoren feststellen konnten, das freilich in weiten Grenzen ganz außerordentlichen Schwankungen unterworfen war. Wir verweisen in dieser Hinsicht auf Versuch 12 bis 14 unserer II. Mitteilung, in denen dieses Verhalten der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren gegenüber Meerschweinchenleberzellen deutlich zum Ausdruck kommt. Wir haben ebenso wie Forssman in einzelnen Versuchen auch die Beobachtung gemacht, daß auf Grund der Abgußuntersuchung den Meerschweinchenleberzellen ein einigermaßen beträchtliches Bindungsvermögen für Hammelblut-Kan.-Amboceptoren zu fehlen schien, stets konnten wir aber aus dem Resultat der Hämolyse beim Übergang des hämolytischen Amboceptors von Meerschweinchen leberzellen auf Hammelblutkörperchen eine deutliche, wenn auch noch so geringe Amboceptorbindung an die Meerschweinchen leberzellen erkennen.

Wir haben bereits früher hervorgehoben, daß für den Anhänger der Ehrlichschen Theorie die immunisatorische Entstehung von Amboceptoren unbedingt an die Existenz von Rezeptoren gebunden ist. Unter diesem Gesichtspunkte darf daher im Hinblick auf die Forssman'schen Ergebnisse die Vereinigung zwischen Meerschweinchenleberzellen und Hammel-Kan.-Amboceptor in analoger Weise wie das Reaktionsprodukt zwischen Hammelleberzellen, Widder- und Rinderspermatozoen auf der einen Seite und Zg.- und Rd.-Kan.-Amboceptor auf der anderen Seite, als eine echte Amboceptor-Receptor-Verbindung angesehen werden.

Wenn auch Forssman ausdrücklich angibt, daß es ihm nicht gelungen sei, durch Behandlung von Kaninchen mit Meerschweinchenblutkörperchen spezifische Hämolysine für Hammelblut zu erzeugen, so müssen doch immerhin die geschilderten Befunde zur Vorsicht hinsichtlich der Deutung des Bindungsprozesses zwischen osmierten Blutkörperchen und hämolytischen Amboceptoren mahnen. Es ist nämlich bei den weitgehenden Verwandtschaften, wie sie zwischen dem Receptorenapparat artgleicher Erythrocyten und Organzellen bestehen, durchaus denkbar, daß sich auch an den Blutkörperchen des Meerschweinchens die analogen Receptorengruppen in Latenz vorfinden, die bei der Injektion der Meerschweinchenorganzellen zur Produktion von Amboceptoren für Hammelblut führen, und es ist weiter denkbar, daß diese Receptoren erst unter dem Einflusse der Osmiumsäurewirkung zur Ausprägung gelangen, indem sie erst nach der Zerstörung des nativen Receptorenapparates der Erythrocyten manifest werden.

Daß diese hypothetischen Receptoren mit den nativen Receptoren der normalen Erythrocyten nicht wesensgleich sein dürften, ist im Abschnitt C dieser Mitteilung gezeigt worden. Es geht nun weiter aus den folgenden Versuchen hervor, daß auch das Reaktionsprodukt zwischen osmiertem Meerschweinchenblut und den heterologen Hammelblut-Kan.-Amboceptoren in gleicher Weise reversibel ist, wie die Verbindung zwischen osmiertem Hammelblut und seinen homologen hämolytischen Amboceptoren, und daß der Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von osmiertem Meerschweinchenblut auf normale Hammel- und Rindererythrocyten von denselben Gesetzmäßigkeiten beherrscht wird, wie wir sie als charakteristisch für den Amboceptorübergang von Organzellen auf homologe und heterologe Blutkörperchen kennen gelernt haben. Siehe Tabelle II auf S. 242.

Wenn wir die Resultate dieser 3 Versuche ins Auge fassen, so sehen wir, daß osmierte Meerschweinchenblutkörperchen Ziegen- und Hammelblut-Kan.-Amboceptoren zu binden ver-

Tabelle II.

Übergang der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von mit Osmiumsäure behandelten Meerschweinchenblutkörperchen auf normale Hammel-Erythrocyten.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Hammelblut	Versuch	Osmierte Meerschweinchen-Erythrocyten: bei Darbietung von Hammelblut-Kan.-Amboceptor binden von								geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von
			1 l. D.	2 l. D.	4 l. D.	5 l. D.	6 l. D.	10 l. D.	15 l. D.	20 l. D.	
25. XI. 1911	0,002	9	—	—	—	5	—	> 5	> 5	6	6 Einheiten
26. XI. 1911[1]	0,025	10	< 1	< 1	fast 1	—	1	—	—	—	1 Einheit
18. I. 1912	0,0003	11	—	—	—	4	—	5	5	6	6 Einheiten

Tabelle III.

Übergang der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von mit Osmiumsäure vergifteten Meerschweinchenblutkörperchen auf normale Rinderblutkörperchen.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Rinderblut	Versuch	Osmierte Meerschweinchenblutkörperchen: bei Darbietung von Hammelblut-Kan.-Amboceptor binden von								geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von
			1 l. D.	2 l. D.	3 l. D.	4 l. D.	5 l. D.	10 l. D.	15 l. D.	20 l. D.	
14. XII. 1911 (H. J. 1)	0,008	12	1	2	3	4	—	—	—	—	1 Einheit
18. I. 1912	0,002	13	—	—	—	—	< 1	1	1	1	1 Einheit

[1]) **Dieser auf Hammelblut wirkende** Amboceptor wurde durch intraperitoneale Injektion von Widderspermatozoen gewonnen.

mögen, und daß von den mit Osmiumsäure behandelten Meerschweinchen-Erythrocyten ein Übergang dieser hämolytischen Amboceptoren auf frisch hinzugefügtes normales homologes Blut erfolgt. Das Bindungsvermögen der Meerschweinchenblutzellen schwankt hierbei in erheblichen Grenzen in ähnlicher Weise, wie wir dies für Meerschweinchenleberzellen und Hammelblut-Kan.-Amboceptoren festgestellt haben. So werden in Versuch 9 und 11 von 20 dargebotenen Amboceptoreinheiten ca. 6 Einheiten gebunden, während in Versuch 10 es bei Darbietung von 6 Einheiten nur zu einer Bindung von ca. 1 Amboceptoreinheit kommt. Diese eine lösende Dosis geht auf das frisch hinzugefügte Hammelblut über, so daß analog früheren Erfahrungen an Meerschweinchenleberzellen eine Desensibilisierung der amboceptorbeladenen osmierten Meerschweinchen-Erythrocyten eintritt. Ob in diesem Versuche 10 nicht die konstitutionelle Beschaffenheit des Widderspermatozoen-Amboceptors eine besonders gewichtige Rolle spielt, muß dahingestellt bleiben. In Versuch 9 und 11 tritt der Übergang des Amboceptors auf frisches Hammeblut bei ursprünglicher Verankerung von ca. 5 lösenden Dosen in die Erscheinung.

Die Verhältnisse beim Übergang der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von osmierten Meerschweinchen-Erythrocyten auf Rinderblutkörperchen geben die in der Tabelle III auf S. 242 zusammengefaßten Versuche wieder.

Es vermögen somit die mit Osmiumsäure behandelten Erythrocyten des Meerschweinchens hämolytische Amboceptoren, die durch Hammelblutbehandlung von Kaninchen gewonnen sind, zu verankern und auf frisch hinzugefügtes homologes und heterologes Blut abzugeben in der gleichen Weise, wie wir dies früher bei Verwendung von homologen Organzellen und bei Verwendung von Leberzellen des Meerschweinchens beobachtet haben. Das Bindungsvermögen der osmierten Meerschweinchenzellen für die auf Rinderblut wirkende hämolytische Komponente der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren ist in Versuch 13 sehr gering und dürfte kaum eine Amboceptor-Einheit überschreiten, ist aber, wie Versuch 12 zeigt, nicht unbeträchtlichen Schwankungen unterworfen.

Überblicken wir diese Ergebnisse, so liegt es bei den übereinstimmenden Verhältnissen, wie wir sie beim Amboceptorübergang von osmierten Meerschweinchen-Erythrocyten, bzw. Meerschweinchenorganzellen auf Blutkörperchen angetroffen haben, nahe, den Prozeß der Bindung und des Überganges des Amboceptors bei Verwendung osmierter Hammelblutkörperchen und Meerschweinchen-Erythrocyten in seinem Wesen den Phänomenen des Amboceptorüberganges von Hammel- und Meerschweinchenorganzellen auf frisch hinzugefügtes Blut an die Seite zu stellen und auf Grund der zahlreichen Analogien auch dort die Existenz spezifischer Beziehungen zwischen den in Reaktion tretenden Komponenten zu supponieren.

Es setzt diese Anschauung von dem spezifischen Charakter der Bindungsreaktion zwischen osmierten Hammel- und Meerschweinchen-Erythrocyten einerseits und den Hammelblut-Kan.-Amboceptoren andererseits, entsprechend dem hier vorliegenden Tatsachenmaterial, freilich voraus, daß zwischen den Receptoren der normalen roten Blutkörperchen und den bei der Bindung der hämolytischen Amboceptoren an osmierte Erythrocyten in Funktion tretenden Apparaten weitgehende Differenzen bestehen, und daß ferner die letzteren sich in einem nahen verwandtschaftlichen Verhältnis zu den Receptoren der Organzellen der betreffenden Tierart befinden müssen.

In Bestätigung der früheren Angaben von Coca und v. Szily ist es uns gleichfalls nicht gelungen, mit osmierten Hammelblutkörperchen hämolytische Immunsera für Hammelblut zu erzeugen, und das gleiche trifft auch für osmierte Meerschweinchen-Erythrocyten zu, die sich auch bei verschieden starker Osmierung als unfähig zur Hammelbluthämolysinproduktion erwiesen. Das Fehlen immunisatorischer Eigenschaften der osmierten Hammel- und Meerschweinchenblutkörperchen für Hammelblut kann jedoch nicht als ein beweisender Einwand gegen die Existenz solcher Gruppen an den osmierten Blutzellen angeführt werden, da bekanntlich die spezifische Bindung der Antigene mittels der antikörperbindenden Gruppe

noch nicht ohne weiteres die Einleitung des Sekretionsstadiums erfordert[1]).

Unsere Versuche über die Art der Bindung zwischen hämolytischem Amboceptor und osmierten Blutzellen auf dem Wege des Komplementbindungsverfahrens einen Aufschluß zu erlangen, haben zu dem Resultat geführt, daß durch die Vereinigung von Hammelblut-Kan.-Amboceptor und osmierten Hammel- und Meerschweinchen-Erythrocyten ein nennenswerter Komplementverbrauch nicht stattfindet. Wir begegnen hier analogen Befunden, wie wir sie seinerzeit z. B. auch bei der Digerierung von Meerschweinchenleberzellen mit Hammelblut-Kan.-Amboceptoren angetroffen haben.

Wir sind uns bewußt, daß auf der Basis unserer Experimente der spezifische Charakter der Amboceptorbindung durch osmierte Blutkörperchen noch nicht bewiesen ist. Unsere Versuche zeigen aber jedenfalls, daß das experimentelle Material von v. Szily keineswegs mit genügender Sicherheit den Schluß auf ein den osmierten Blutzellen eigenes der Spezifität ermangelndes Adsorptionsvermögen für hämolytische Amboceptoren zuläßt, und daß es möglich ist, den Prozeß der Amboceptorbindung an osmierte Blutzellen und selbst den Prozeß der Fixation spezifischer Hammelbluthämolysine an osmierte Meerschweinchenblutkörperchen auch unter dem Gesichtspunkt spezifischer Vorgänge zu betrachten.

Zusammenfassung.

1. Von mit Osmiumsäure behandelten Hammelblutkörperchen gehen Hammelblut-Kan.-Amboceptoren auf normales Hammelblut über.

2. Von mit Osmiumsäure behandelten homologen Erythrocyten erfolgt ein Amboceptorübergang auf die heterologe Blutart. So gehen Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von osmierten Hammelblutkörperchen auf normale Rindererythrocyten über,

[1]) Ehrlich und Morgenroth, Über Hämolysine III. Berl. klin. Wochenschr. 1900, Nr. 21. — R. Pfeiffer, Referat auf dem XIII. internationalen Kongreß für Hygiene, Brüssel 1905. — A. Wassermann, ibidem und in Kolle-Wassermanns Handb. d. pathog. Mikroorganismen 4, 1909. — v. Dungern, Die Antikörper 1903.

während von normalem Hammelblut auf Rinderblut kein Übergang von Hammelblut-Kan.-Amboceptor selbst bei reichlicher Sensibilisierung der Hammelerythrocyten erfolgt.

3. Durch vorangehende starke Sensibilisierung der nativen Erythrocyten wird das Bindungsvermögen der nachträglich stark osmierten Blutkörperchen für hämolytisehe Amboceptoren nicht beeinträchtigt. Die Fixation des hämolytischen Amboceptors an osmierte Erythrocyten erfolgt somit nicht durch die gleichen Apparate, die die Bindung der hämolytischen Immunkörper an normale Blutkörperchen vermitteln.

4. Die Vereinigung zwischen Meerschweinchenleberzellen und Hammelblut-Kan.-Amboceptor ist im Hinblick auf die Forssman'schen Ergebnisse von der immunisatorischen Auslösung von spezifischen Hammelbluthämolysinen durch Meerschweinchenorganzellen-Injektionen als eine echte Amboceptor-Receptor-Verbindung anzusehen in analoger Weise, wie das Reaktionsprodukt zwischen Hammelleberzellen, Widder- und Rinderspermatozoen auf der einen Seite und Hammelblut- und Rinderblut-Kaninchen-Amboceptor andererseits. (Morgenroth und Rosenthal.

5. Mit Osmiumsäure behandelte Meerschweinchenerythrocyten vermögen Hammelblut- und Rinderblut-Kan.-Amboceptoren zu binden (v. Szily) und an homologe und heterologe Blutkörperchen abzugeben.

6. Die zahlreichen Analoga in den Phänomenen der Amboceptorbindung und des Amboceptorüberganges, wie sie zwischen osmierten Hammel- und Meerschweinchenblutkörperchen und den Organzellen der gleichen Tierarten bestehen, legen die Möglichkeit einer spezifischen Receptor-Amboceptorbindung bei der Fixation der hämolytischen Amboceptoren an osmierte Blutzellen nahe.

Über die Bedeutung der Proteolyse für die spezifische Hämolyse.

Von

Kohshi Ohta (Tokio).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 25. September 1912.)

Von Anfang an sind von den Forschern die deutlichen Analogien zwischen der Hämolyse und den Fermentwirkungen beachtet worden. Insbesondere auch die spezifische Hämolyse wurde vielfach als Fermentprozeß gedeutet und das Komplement als Ferment aufgefaßt. Es ist in der Tat sehr wahrscheinlich, daß Beziehungen zwischen den cytolytischen und den enzymatischen Vorgängen bestehen. Im einzelnen weiß man jedoch noch wenig darüber, was für Fermentwirkungen bei der Hämolyse mitwirken. Erwähnt seien die interessanten Beobachtungen von Neuberg[1]) und seinen Mitarbeitern, nach denen ein unverkennbarer Parallelismus zwischen Lipolyse und Hämolyse nicht zu übersehen ist, zumal die von Neuberg mit aller Reserve entwickelten Vorstellungen durch mehrere Publikationen anderer Autoren der letzten Jahre gestützt worden sind.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob mit der spezifischen Hämolyse eine nachweisbare Proteolyse parallel geht. Als Resultat ergab sich, daß eine nachweisbare Proteolyse parallel mit der spezifischen Hämolyse nicht zur Beobachtung kommt. Wäre Proteolyse parallel mit der Hämolyse nachweisbar gewesen, so wäre damit noch nicht der Beweis er-

---

[1]) Neuberg und Rosenberg, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2 sowie Neuberg und Reicher, Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 35 und diese Zeitschr. 4, 281, 1907.

Tabelle.

Versuchstier	1. Einspritzung			2. Einspritzung			3. Einspritzung			Entblutung	
	Datum	Menge ccm	Körpergewicht g	Datum	Menge ccm	Körpergewicht g	Datum	Menge ccm	Körpergewicht g	Datum	Körpergewicht g
1. Kaninchen, grauweiß I . . .	4. XII. 11	3,0	2410	11. XII. 11	2,0	2440	18. XII. 11	1,0	2485	28. XII. 11	1970
2. " grau . . .	11. XII. 11	2,0	2780	9. I. 12	1,0	2750	16. I. 12	1,0	2770	24. I. 12	2840
3. " grauweiß II .	9. I. 12	5,0	2460	16. I. 12	2,0	2380	23. I. 12	1,0	2470	6. II. 12	2485

bracht, daß zum Wesen der Hämolyse Proteolyse gehört. Ebenso ist auch nicht auszuschließen, daß eine mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachweisbare, quantitativ geringfügige Proteolyse bei der Hämolyse mitwirkt.

Das erhaltene Resultat hat aber noch nach einer anderen Richtung Interesse. Bekanntlich wird die Wirkung der Antikörper in nahe Analogie zu der Darmverdauung der Eiweißkörper gesetzt und die Antikörperfunktion in einem parenteralen Eiweißabbau gesucht. Wenn diese Vermutung zu Recht bestehen und der Eiweißzerfall wirklich das maßgebende Moment der Antikörperwirkung darstellen würde, dann hätte man erwarten müssen, daß die Auflösung der Blutkörperchen durch den hämolytischen Antikörper mit einem erheblichen Eiweißabbau einhergeht.

Darstellung und Prüfung des Immunserums.

Drei Kaninchen von 2 bis 3 kg Gewicht wurden je 1 bis 5 ccm zweimal gut gewaschene Hammelblutkörperchen in die Ohrvenen injiziert. Die Injektion erfolgte im ganzen dreimal in absteigender Dosis und wöchentlichem Intervall. Die Tiere vertragen die Einspritzungen gut. Etwa eine Woche nach der letzten intravenösen Injektion wurden die Tiere entblutet. Die Sera wurden festverschlossen im Eisschrank schwach carbolisiert aufbewahrt und blieben viele Monate gut wirksam. In sämtlichen Versuchen genügte ein einziges Serum von denen, die zur Verfügung standen. Die einzelnen Daten sind aus nebenstehender Tabelle zu ersehen.

Die spezifisch hämolytische Wirkung des Immunserums (Kaninchen, grauweiß I, den 28. Dez. 1911 entblutet) wurde in zwei Reien

im Anfang und während der Versuche, geprüft. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

Tabelle.

I. (Am 40. Tage nach der Gewinnung.)

Hammelblutkörperchen 5:100 ccm	Amboceptor ccm	Komplement 1:10 ccm	Physiol. NaCl ccm	Befund nach 25 Min.	2 Std.
1,0	1,0 ($^1/_{1000}$-Verd.)	1,0	—	++	+++
1,0	1,0 ($^1/_{10000}$ „)	1,0	—	+	++
1,0	1,0 ($^1/_{50000}$ „)	1,0	—	—	+
1,0	—	—	2,0	—	—

II. (Am 168. Tage nach der Gewinnung.)

Hammelblutkörperchen 5:100 ccm	Amboceptor 1:500 ccm	Komplement 1:10 ccm	Physiol. NaCl ccm	Befund nach 25 Min.	2 Std.
1,0	1,0	1,0	0,5	++	+++
1,0	0,5	1,0	1,0	++	+++
1,0	0,1	1,0	1,4	+	++
1,0	—	1,0	1,5	—	—

Das Immunserum war also ausreichend wirksam.

Prüfung auf Proteolyse.

Frisch vom Schlachthof gebrachtes Hammelblut wurde sofort mit Hilfe der Zentrifuge 2mal mit physiologischer Kochsalzlösung gut gewaschen. Nach dem Absitzen wurden die roten Blutzellen getrennt und dann im Eisschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden 5 bis 10 ccm des Blutkörperchenbreies nach gutem Schütteln mit einer Meßpipette in einem Erlenmeyerkolben abgemessen.

Je 10 ccm Amboceptor wurden meistens in $^1/_{500}$iger Verdünnung, nur in den letzten 2 Proben $^1/_{250}$iger Verdünnung verwandt. Diese Quantität war nach obigem Vorproben als sicher wirksame maximale Menge des Immunserums vom Kaninchen für 5 bis 10 ccm Hammelblutkörperchen austitriert worden. Als Komplement diente frisch gewonnenes und gut zentrifugiertes Meerschweinchenserum. Von 3 bis 5 Tieren gesammelte Sera wurden gemischt und dann für die einzelnen Proben abgeteilt.

Es wurde also gemischt: Blutkörperchenbrei, Immunserum und Komplement. In Kontrollproben wurde das Komplementserum durch Anteile desselben Serums ersetzt, die vorher 30 Minuten auf 54° im Wasserbad erwärmt worden waren. Haupt- und Kontrollproben wurden gleichmäßig mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Die Ver-

dünnung schwankte in den einzelnen Versuchen zwischen 30 und 200 ccm.

Alle Prozeduren wurden in sterilen Gefäßen vorgenommen. Die Gläser waren während der Versuche mit Watte verschlossen. Der Brutschrankaufenthalt wurde stets auf 2 Stunden bemessen, während welcher Zeit die Gemische öfters geschüttelt wurden. Die Hauptproben waren stets gut hämolysiert, die Kontrollen völlig unverändert.

Meistens schon in $^1/_2$ Stunde war ein auffallender Unterschied zwischen den hämolysierten und den nichthämolysierten Versuchen deutlich nachweisbar. Nach 2 Stunden Brutschrankaufenthalt wurden die Proben in Porzellanschalen ausgegossen und mit ca. 120 ccm 5%iger Kochsalzlösung gewaschen, zu denen 10 ccm 10%ige saure Kaliumphosphatlösung zur Ansäuerung hinzugefügt wurden. Natürlich war in Vorversuchen vorher mehrmals geprüft worden, daß die Eiweißfällungsmethode gute Resultate für Hammelblutkörperchen ergibt. Nun wurden die Proben auf dem Drahtnetz zum Sieden gebracht und einige Zeit gekocht, bis die vollständige Koagulation des Eiweißes erfolgte. Dann wurde die Lösung abfiltriert. Das Filtrat blieb jedesmal ganz klar und fast farblos. Nachdem der Rückstand auf dem Filter mehrmals mit heißer physiologischer Kochsalzlösung und einigen Kubikzentimeter 10%igem saurem Kaliumphosphat gewaschen war, wurde das Waschwasser mit dem Filtrat vereinigt. Die gesammelte Flüssigkeit wurde in Rundkolben nach dem Zusatz von 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure stark eingeengt und endlich vorschriftgemäß kjeldahlisiert. Die einzelnen Kjeldahlanalysen gaben in allen wiedergegebenen Versuchen gut übereinstimmende Resultate.

In allen Versuchen wurde auch in Proben, die von Anfang an getrennt behandelt waren, die Menge des inkoagulablen Stickstoffes gut übereinstimmend gefunden. Abgesehen von Nr. 3 war das auch der Fall, ganz unabhängig davon, ob eine Probe hämolysiert war oder nicht.

Die Resultate der einzelnen Versuche sind aus der nunmehr folgenden Tabelle (S. 251) zu ersehen.

Endlich sollte geprüft werden, ob die geringfügigen Mengen unkoagulablen Stickstoffes, die in den einzelnen Versuchen gefunden wurden, vielleicht schon vom Serum allein herstammen, so daß die Blutkörperchen überhaupt nichts oder nur Spuren zu dieser Fraktion beisteuern, gleichgültig, ob sie hämolysiert sind oder nicht. Der betreffende Versuch konnte auch noch folgendem Einwand Rechnung tragen. Da die Kontrollportionen einige Zeit erwärmt sind, so war es möglich, daß hierbei Spaltungsprodukte gebildet wurden, deren Menge etwa denen, die bei der Hämolyse entstehen, entspricht. Ein Plus zugunsten der Hämolyse konnte so verdeckt werden. Da aber der Versuch genau die gleichen Werte beim nichterwärmten

Tabelle.
(Brutschrankzeit immer 2 Stunden.)

Versuchs-Nr.		Verdünnung mit physiol. NaCl ccm	Hämolyse		Ergebnisse der Kjeldahlisierung: Verbrauchte $^n/_{10}$-Säure ccm	Ergebnisse der Kjeldahlisierung: N in g pro 100 ccm Hammelblutkörperchen
1	Hammelblutkörperchen 10,0 ccm $^1/_{500}$-Amboceptor . . . 1,0 „ Komplement . . . . . 4,0 „	30	unvollkommen	Komplement aktiv „ inaktiv	3,8 3,2	0,0532 0,0448
2	Hammelblutkörperchen 5,0 ccm $^1/_{500}$-Amboceptor . . . 1,0 „ Komplement . . . . . 3,4 „	50	gut	Komplement aktiv „ inaktiv	4,5 4,6	0,0630 0,0644
3	Hammelblutkörperchen 10,0 ccm $^1/_{500}$-Amboceptor . . . 10,0 „ Komplement . . . . . 6,5 „	60	sehr gut	Komplement aktiv „ inaktiv	6,6 4,6	0,0924 0,0644
4	Hammelblutkörperchen 10,0 ccm $^1/_{500}$-Amboceptor . . . 10,0 „ Komplement . . . . . 5,0 „	100	sehr gut	Komplement aktiv 1 „ „ 2 „ inaktiv	5,0 5,4 5,3	0,0700 0,0756 0,0742
5	Hammelblutkörperchen 10,0 ccm $^1/_{500}$-Amboceptor . . . 10,0 „ Komplement . . . . . 4,0 „	100	sehr gut	Komplement aktiv 1 „ „ 2 „ inaktiv	5,3 5,1 5,1	0,0742 0,0714 0,0714
6	Hammelblutkörperchen 10,0 „ $^1/_{500}$-Amboceptor . . . 10,0 „ Komplement . . . . . 5,0 „	170	sehr gut	Komplement aktiv 1 „ „ 2 „ inaktiv 1 „ „ 2	6,2 5,5 5,9 5,3	0,0868 0,0770 0,0826 0,0742
7	Hammelblutkörperchen 10,0 ccm $^1/_{250}$-Amboceptor . . . 10,0 „ Komplement . . . . . 5,0 „	200	sehr gut	Komplement aktiv „ inaktiv	5,6 5,1	0,0734 0,0714
8	Hammelblutkörperchen 10,0 ccm $^1/_{250}$-Amboceptor . . . 10,0 „ Komplement . . . . . 4,0 „	120	sehr gut	Komplement aktiv 1 „ „ 2 „ inaktiv 1 „ „ 2	4,8 4,4 4,3 4,4	0,0672 0,0616 0,0602 0,0616

und beim erwärmten Serum ergab, so fällt dieser Einwand fort. Der Versuch zeigt außerdem, daß die autolytische Proteolyse der roten Blutkörperchen unter den gewählten Versuchsbedingungen und innerhalb der Versuchszeit höchstens minimal vorhanden sein kann, ob spezifische Hämolyse dazu kommt oder nicht.

Je 10 ccm frisch gewonnenes Meerschweinchenserum wurden einerseits bei 54° 30 Minuten inaktiviert und andererseits nicht erwärmt, auf 100 ccm mit steriler Kochsalzlösung verdünnt. Nun kommen die Proben ohne Zusatz von Blutkörperchen und ohne Immunserum für 2 Stunden in den Brutschrank und wurden dann ganz wie die Hauptversuche behandelt. Für 10 ccm nicht erwärmtes Komplement ergab

sich 0,0102 g unkoagulierbaren Stickstoffs, d. h. pro 100 ccm Komplement berechnet 0,1022 g N, während für 10 ccm vorher erhitztem Komplement 0,01015 unkoagulierbaren Stickstoffs, pro 100 ccm Komplement = 0,1015 g N, gefunden wurden. Daraus folgt, daß die Erhitzung des Komplements bei 54° gar keine in Betracht kommende Menge Spaltungsprodukte lieferte.

Schluß.

Wenn die Arbeit also zeigt, daß die spezifische Hämolyse ohne nachweisbare Proteolyse abläuft, so wird man in Zukunft seine Aufmerksamkeit anderen Fermentwirkungen zuwenden müssen. Vielleicht aber ist das Eingreifen der Enzyme bei der Cytolyse nur ein verhältnismäßig geringfügiges neben den übrigen chemischen und physikalischen Reaktionen, die das Wesen des Prozesses ausmachen.

Über Lipoide.

Von

Sigmund Fränkel.

XVI. Mitteilung.

Über den Cholesteringehalt der einzelnen Gehirnabschnitte.

Von

P. Kirschbaum und K. Linnert.

(Aus dem Laboratorium der L. Spiegler-Stiftung.)

(Eingegangen am 16. September 1912.)

In einer früheren Mitteilung hatte der eine von uns[1]) die Vermutung ausgesprochen, daß „bestimmten Funktionsstörungen des Gehirns konstant Veränderungen im Gehalt oder in der Gruppierung seiner Lipoide entsprechen“ und daß man vielleicht durch ein eingehendes Studium der quantitativen Verteilung der einzelnen Lipoide in den verschiedenen Gehirnabschnitten bei pathologischen Zuständen zu näheren Aufschlüssen über die funktionelle Bedeutung dieser für die Abwicklung der Gehirntätigkeit zweifellos höchst wichtigen Substanzen gelangen könnte.

In der Absicht, den Chemismus der einzelnen Gehirnabschnitte zu studieren, bestimmte Linnert[2]) nach S. Fränkels Methode der fraktionierten Extraktion der Gehirnlipoide die Menge des Aceton-, Petroläther-, Benzol- und Alkoholextraktes im Gesamthirn sowie in einzelnen Abschnitten desselben.

Wir sind nun heute in der Lage, einige Daten betreffend die Verteilung des Cholesterins im Gehirne vorzubringen.

---

[1]) Diese Zeitschr. 26, 44.

[2]) l. c.

Über das Mengenverhältnis des Cholesterins in einzelnen Gehirnpartien liegen bis jetzt, wenn man von einer Bestimmung Thudichums absieht, keinerlei Angaben vor.

Die Acetonextraktzahlen von Linnert drücken nicht ohne weiteres den Cholesteringehalt des Gehirnes aus, da ja dieses Lösungsmittel neben dem Cholesterin auch andere Lipoide in nicht unerheblichen Mengen mit herausholt.

Thudichum fand in einem Gehirn, bei einem „vorläufigen Versuch“ zur quantitativen Cholesterinbestimmung:

	Analysierte Menge			
In der rechten Hemisphäre	465 g	8,93 g	Cholesterin	= 1,92 %
„ „ linken „	463 g	6,99 g	„	= 1,51 %
„ dem Kleinhirn	124 g	1,95 g	„	= 1,57 %
„ „ Mittelhirn und verlängerten Mark . .	33 g	1,01 g	„	= 3,06 %
„ der weißen Substanz . .	66 g	2,15 g	„	= 3,26 %
„ „ grauen „ . .	46 g	0,90 g	„	= 1,95 %

Für das Rückenmark fand L. Dimitz[1]) Werte zwischen 3,35 bis 4,26 %.

Was unsere Technik betrifft, so gingen wir so vor, daß wir möglichst frisch aus der Leiche gewonnenes Gehirn von den Gehirnhäuten befreiten, wogen und in die einzelnen anatomischen Partien zerschnitten. Hierauf wurde jeder Teil für sich gewogen, entweder ganz oder zu einem aliquoten Teil zu einem Brei zerhackt und mehrmals mit der etwa doppelten Menge 95 %igen Alkohols ausgekocht. Der Alkohol wurde jedesmal dekantiert und schließlich vereinigt auf dem Wasserbade verjagt, der zurückbleibende Rückstand in Petroläther aufgenommen und letzterer in die Hülse eines Soxhletapparates gegossen. In dieselbe brachten wir nun auch den durch das wiederholte Kochen mit Alkohol fest gewordenen, wasserfreien Hirnbrei und extrahierten hierauf so lange mit Petroläther, bis sich der Inhalt der Hülse als cholesterinfrei erwies. Sodann wurde der petrolätherische Extrakt, bzw. ein aliquoter Teil desselben (s. unten) auf dem Wasserbade vom Petroläther befreit und der Rückstand erschöpfend und unter stetigem Umrühren mit einem Glasstabe mit siedendheißem 95 %igem Alkohol ausgeholt. Letzterer wurde sogleich mittels eines

[1]) Diese Zeitschr. 28, 295.

Heißwassertrichters filtriert und heiß mit einer heißen 1 %igen Digitoninlösung nach A. Windaus[1]) gefällt.

Da es sich im Verlaufe unserer Arbeit herausstellte, daß unser Digitoninvorrat nicht hinreichen würde, um alles Cholesterin auszufällen, gingen wir, um mit dem teueren Digitonin zu sparen, in der Folge so vor, daß wir die Petrolätherextrakte im Meßkölbchen auf ein bestimmtes Volumen auffüllten und bloß entsprechend kleine aliquote Teile zur Cholesterinbestimmung nahmen. Dieses Verfahren, nur Bruchteile der Extrakte zu nehmen, empfiehlt sich auch aus dem Grunde, weil sonst das Kephalin aus massigen Niederschlägen durch Waschen mit Äther nur äußerst schwer entfernbar ist.

Der Niederschlag wurde in einen gewogenen Goochtiegel gebracht, mit Alkohol und Äther mehrmals gewaschen, sodann bei 100 bis 110° zur Konstanz getrocknet und gewogen. Die Ermittlung des Gehaltes des Niederschlages an Cholesterin geschah nach der Formel von Windaus[2]):

$$C = A \times 0{,}2431,$$

wobei A das Gewicht des Additionsproduktes, C dasjenige des Cholesterins bedeutet.

Wir haben in dieser Weise an einem 1280 g schweren Gehirn eines erwachsenen Mannes isolierte graue und weiße Substanz des Großhirns untersucht, ferner das Kleinhirn und die Brücke mit dem verlängerten Marke. Daneben bestimmten wir den Cholesteringehalt im Gesamthirn einer erwachsenen Frau.

Folgende Tabelle enthält die Resultate unserer Untersuchungen. Die Gewichtsangaben beziehen sich sämtlich auf die feuchte Substanz.

Geschlecht	Gesamtgewicht g	Teil	Gesamtgewicht g	Versuchsmenge g	Gewicht des Additionsproduktes g	Cholesterin absolut	Cholesterin %
Mann	1280	Rinde	—	47	2,2337	0,543	1,15
		Weiße Substanz	—	49	4,9850	1,212	2,47
		Kleinhirn . .	115	50	2,6940	0,655	1,31
		Brücke und verlängertes Mark	23	23	3,8133	0,927	4,03
Frau	1127		1127	38	4,2000	1,021	2,69

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 110.

[2]) l. c.

Vergleicht man unsere Zahlen mit dem oben angeführten Ergebnisse Thudichums, so sieht man nur eine beiläufige Übereinstimmung. Doch gibt Thudichum selbst zu, daß es sich um einen „vorläufigen Versuch" handelte, und daß ihm durch die „Operation" nicht unbeträchtliche Mengen Cholesterins wahrscheinlich verloren gingen.

Die von uns erhaltene Zahl für Brücke und verlängertes Mark spricht für einen großen Reichtum dieser Teile an Cholesterin, analog den Befunden, wie sie im Rückenmark erhoben wurden. Doch ist nicht zu leugnen, daß dieser von uns ermittelte hohe Cholesteringehalt der genannten Organe in Anbetracht der Tatsache, daß die Brücke zu einem nicht unerheblichen Teile aus sonst relativ cholesterinarmer grauer Substanz besteht, recht auffallend ist. Möglicherweise fiel hier die eine Komponente: das verlängerte Mark, bei der Bestimmung zu sehr ins Gewicht, so daß eine getrennte Untersuchung eines jeden der beiden Teile zu anderen Resultaten führen würde.

Es ist übrigens wahrscheinlich, daß auch normalerweise recht beträchtliche Schwankungen im Gehalte der Gehirnabschnitte an verschiedenen Lipoiden vorkommen. Darüber können jedoch nur weitere Untersuchungen, an einem größeren Material angestellt, Aufschluß geben.

Einige Bemerkungen über die Mettsche Methode nebst Versuchen über das Aciditätsoptimum der Pepsinwirkung.

Von

Johanne Christiansen.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 16. September 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Metts[1]) Methode zur Pepsinbestimmung wurde im Jahre 1889 von S. G. Mett angegeben und erschien erst in russischer, später (1894) auch in deutscher Sprache. Die Methode wird von Mett selbst folgendermaßen beschrieben:

Hühnereiweiß wird in Capillarröhren aufgesaugt und danach eine Minute in Wasser von 95° erwärmt, wobei das Eiweiß koaguliert. Für den Verdauungsversuch werden kleine Stückchen von diesen Röhren abgeschnitten und mit der betreffenden Pepsinlösung z. B. 24 Stunden hindurch im Thermostaten stehen gelassen. Die Menge von gelöstem Eiweiß wird dann direkt in Millimeter abgelesen und gibt so ein Maß der peptonisierenden Kraft an.

Diese Methode hat vor anderen Methoden den großen Vorzug, daß das Substrat während der Verdauung konstant bleibt. Der Gegenstand der Verdauung ist nämlich eine kleine Eiweißfläche, deren Größe durch die Verdauung keine Änderung erleidet, sondern nur weiter in das Röhrchen hinein verschoben wird. Auf diese Weise wird die Wirkung der Menge und Oberfläche des Substrates, die bei anderen Methoden eine große, die Verhältnisse komplizierende Rolle spielt, vollständig eliminiert.

---

[1]) S. G. Mett, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. **1894**, S. 68.

Außer von der russischen Schule (Pawlow, Borissow, Samojloff)[1]) wurde diese Methode auch von Hammarsten[2]), Linossier[3]), Nirenstein[4]), Schiff u. a. benützt und lieferte in deren Händen schöne Resultate. So ergab sich aus Borissows Untersuchungen, daß das Schützsche Gesetz innerhalb gewisser Grenzen für diese Methode Geltung hat, d. h. daß die verdauten Rohrlängen mit der Quadratwurzel der Pepsinmenge proportional sind, so daß man also durch Quadrieren der verdauten Anzahl von Millimeter einen relativen Wert für die anwesende Pepsinmenge erhält. Wenn also z. B. eine gewisse Pepsinmenge 3 mm verdaut, so würde die vierfache Pepsinmenge die doppelte Länge, nämlich 6 mm, verdauen.

Für den klinischen Gebrauch wurde die Methode von Nirenstein und Schiff modifiziert; diese Verfasser wiesen nach, daß unverdünnter Mageninhalt wegen seines Gehaltes an hemmenden Stoffen weit weniger von den Eiweißröhrchen verdaute, als der tatsächlich vorhandenen Pepsinmenge entsprechen würde, und daß diese Hemmung durch Verdünnung des Mageninhaltes in dem Verhältnis 1:16 vollständig aufgehoben werden konnte.

Trotz dieser damit erhaltenen interessanten Resultate wurden bald Einwände verschiedener Art gegen Metts Methode erhoben.

So klagt Grützner[5]) darüber, daß während der Koagulation Löcher im Eiweiß gebildet würden und daß die Ablesung schwierig sei. Groß[6]) meint, daß die Eiweißröhren mit der Zeit Veränderungen erlitten und daß die Verdauung durch „Antifermente“, die in den Capillarröhren sich ansammeln sollten, gestört werde. Fuld und Levison[7]) heben den großen Einfluß der Temperatur bei der Koagulation der Eiweißröhren und die Verschiedenheit des Eiweißes verschiedener Eier hervor. Kaiserling[8]) verwirft die Methode, weil das Schützsche Gesetz der Pepsinwirkung nur soweit Geltung hat, solange noch nicht mehr als 8 mm (4 von jeder Seite) verdaut sind. Schorlemmer[9]) meint, daß schlechte Resultate sehr häufig deswegen erhalten werden, weil man die Röhrchen bei der Verdauung ruhig liegen läßt, und er konstruiert daher eine Turbine, um dieselben zu schütteln. Auch Jastrowitz[10]) benützt eine von Siegfried konstruierte Maschine, wobei die Röhrchen 60 mal in der Minute in Eprouvetten auf und ab bewegt werden; trotzdem muß

---

[1]) A. Samojloff, Arch. des sciences biolog. 2, 1893.

[2]) O. Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 18, 1908.

[3]) G. Linossier, Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **1**, 281, 1899.

[4]) E. Nirenstein und A. Schiff, Arch. f. Verdauungskrankh. **8**, 559, 1902.

[5]) P. Grützner, Arch. f. d. ges. Physiol. **106**, 478, 1905.

[6]) O. Groß, Berl. klin. Wochenschr. **1**, 643, 1908.

[7]) E. Fuld und L. Levison, diese Zeitschr. **6**, 473, 1907.

[8]) O. Kaiserling, Berl. klin. Wochenschr. **40**, 1007, 1903.

[9]) R. Schorlemmer, Berl. klin. Wochenschr. **39**, 1193, 1902.

[10]) H. Jastrowitz, diese Zeitschr. **2**, 1907.

er aber doch mit einem Mittelfehler von ca. 20% rechnen. Andere Autoren versuchen durch Benützung besonderer Vorrichtungen für das Abschneiden und die Ablesung die Schwierigkeiten zu beseitigen, und Eug. Solms[1]) endlich schreibt der ganzen Methode nur mehr eine „historische Bedeutung" zu.

Ein Teil der genannten Autoren, die Metts Methode verwerfen, haben als Ersatz andere Methoden vorgeschlagen; so z. B. Grützner, Groß, Fuld und Levison; weiters haben Volhard[2]), Spriggs[3]), Klug[4]), Jacoby[5]) und Liebmann[6]) neue Pepsinmethoden angegeben. Seit 1908 endlich liegt in S. P. L. Sörensens[7]) Formoltitrierung ein rationeller Versuch vor, die proteolytische Spaltung durch Messung der während der Verdauung neu gebildeten Aminogruppen zu verfolgen. Diese letztere Methode ist, insoweit man nur beabsichtigt zu bestimmen, wie umfassend der Abbau des Proteinstoffes unter gewissen Versuchsbedingungen sei, unangreifbar; zur quantitativen Bestimmung der Pepsinmenge ist sie aber, wie der Verfasser selbst hervorhebt [Enzymstudien II, S. 139[8])], weniger brauchbar. Erstens ist sie weit weniger empfindlich als Metts Methode, und zweitens ist sie notwendigerweise mit einer bedeutenden Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Verdauung verbunden, da die neuen Aminogruppen freie Salzsäure binden. Dieser Faktor ist aber von außerordentlicher Bedeutung für die Enzymwirkung und muß während der Versuchszeit konstant gehalten werden. Auch in dieser Beziehung ist die Mettsche Methode, wie es später noch näher nachgewiesen werden soll, vorzuziehen.

Außerdem kann man sowohl gegen die Verwendung der Formoltitrierung als Pepsinmethode, wie auch gegen die meisten anderen Pepsinmethoden den Vorwurf erheben, daß das Substrat während der Verdauung sich stark ändert. Das Pepsin übt, indem es anfänglich das genuine Eiweiß, dann die Acidalbumosen, später die Albumosen, die Peptone usw. angreift, im Laufe der Versuchszeit eine sehr verschiedenartige Wirksamkeit aus, die vielleicht nicht in allen Fällen denselben Gesetzen unterworfen ist. Dagegen wird bei Metts Methode nur eine einzige der Eigenschaften des Pepsins zur Messung benützt, nämlich sein Vermögen, koaguliertes Eiweiß zu lösen, welche Eigenschaft des Pepsins eben von dem größten biologischen Interesse ist. Das Eiweiß wird nämlich dem menschlichen Organismus gewöhnlich in koagulierter Zustandsform zugeführt, dann von Pepsin und Salzsäure im Ventrikel gelöst, und noch lange bevor das Pepsin seine vollständige Wirkung darauf

[1]) E. Solms, Zeitschr. f. klin. Med. 64, 158, 1907.
[2]) F. Volhard, Münch. med. Wochenschr. 50, 2129, 1903.
[3]) E. Spriggs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 465, 1902.
[4]) Ferd. Klug, Arch. f. d. ges. Physiol. 60, 43, 1895.
[5]) M. Jacoby, diese Zeitschr. 2, 144, 1907.
[6]) P. Liebmann, Med. Klinik Nr. 47, 1909.
[7]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 7, 45, 1908.
[8]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

entfalten könnte, durch den Pylorus wieder ausgeführt; der weitere Abbau wird vom Trypsin übernommen.

Der Zweck der folgenden Versuche soll es sein, die physiologisch wichtigste Eigenschaft des Pepsins, nämlich die Fähigkeit, koaguliertes Eiweiß zu lösen, mit Hilfe der Mettschen Methode näher zu untersuchen. Weil die Methode aber, wie erwähnt, Gegenstand ernster Einwände gewesen ist, war es vorerst nötig, einige rein technische Versuche zu unternehmen, um ihre Schwierigkeiten zu untersuchen und womöglich zu beseitigen.

Die Einwände gegen Metts Methode sind teils technischer, teils rein prinzipieller Natur. Erstere müssen aber zuerst behandelt werden, weil eine gute Technik die Bedingung für die Möglichkeit ist, die später zu erwähnenden prinzipiellen Vorwürfe zu überwinden.

Die Versuchstechnik.

Die Hauptschwierigkeiten der Technik sind die folgenden: 1. der große Einfluß der Temperatur bei der Herstellung der Eiweißröhren; 2. die Verschiedenheit des Eiweißes verschiedener Eier.

Was den Temperatureinfluß bei der Herstellung der Eiweißröhren anbetrifft, so sollte man von vornherein glauben, daß es genügen würde, immer bei konstanter Temperatur und konstanter Zeit zu arbeiten. Die meisten Verfasser bedienen sich auch deshalb meist 5, 10 oder 15 Minuten dauernden Erhitzens bei 100 oder 95°. Dieses Verfahren gibt indes kein befriedigendes Resultat. Die Röhren sind oft voller Löcher und zeigen auch nicht alle die gleiche Verdaulichkeit, selbst wenn sie alle zur nämlichen Zeit koaguliert wurden. Verschiedene Forscher geben deshalb auch an, daß es für vergleichende Versuche notwendig ist, nur eine einzige Röhre, aus der ca. 10 bis 12 Versuchsröhrchen à 2 cm geschnitten werden können, zu verwenden, weil man Röhrchen, die aus verschiedenen Röhren mit verschiedener Länge geschnitten wurden, nicht immer untereinander vergleichen kann. Das Verfahren, das die Autoren bei der Koagulation der Röhren anwandten, wird gewöhnlich von diesen nicht eingehend erwähnt;

bei meinen Versuchen hat es sich indessen gezeigt, daß es sehr schwierig ist, ein kochendes Wasserbad von großer Oberfläche (die ja nötig ist, um Röhren von ca. 30 bis 40 cm Länge horizontal hineinlegen zu können) bei so hoher Temperatur konstant zu erhalten; und namentlich am Boden desselben, wohin die Röhren zu liegen kommen, ist die Temperatur — selbst bei Verwendung eines Fischkessels mit doppeltem Boden — an verschiedenen Stellen um mehrere Grade verschieden, weil ja die Gasflamme den Boden des Gefäßes in seiner ganzen Ausdehnung nicht gleichmäßig erwärmt. Jedenfalls ist es mir bei der gewöhnlich angegebenen Technik niemals gelungen, brauchbare Röhren zu erhalten. Nur die von Nirenstein und Schiff verwendete Methode (U-förmige Röhren, die in einem Becherglas bei 95° aufgehängt werden) scheint gute Resultate zu liefern. Die von mir im folgenden verwendete Technik ist indes viel leichter und einfacher und gestattet zugleich eine Standardierung, wobei die Verschiedenheit des Eiweißes verschiedener Eier in Rechnung gezogen wird:

Ein großer Fischkessel mit doppeltem Boden wird mit Wasser (ca. 10 l) gefüllt, mit einem Deckel verschlossen und bis zum Kochen erhitzt. Hat das Kochen begonnen, so wird der Kessel vom Feuer genommen, der Deckel entfernt und das Wasser gut umgerührt. Der spontane Temperaturabfall wird jetzt mittels eines in Zehntelgrade geteilten Thermometers verfolgt; ist die Temperatur bis auf 85° gesunken, so werden die mit Eiweiß gefüllten Capillarröhren auf einmal hineingelegt und bleiben in dem Bade liegen, bis das Wasser abgekühlt ist. Verschließung der einzelnen Röhren vor dem Hineinlegen ist ganz überflüssig, weil die Koagulation augenblicklich eintritt.

Wenn man bei gewöhnlicher Zimmertemperatur arbeitet und immer dieselbe Menge Wasser und denselben Fischkessel benützt, so wird das Wasserbad immer ganz dieselbe Zeit zur Abkühlung brauchen und man kann bei diesem einfachen Verfahren immer sicher sein, daß die Eiweißröhren immer die nämliche Wärmewirkung erfahren, wenn sie nur alle bei der gleichen Temperatur eingelegt wurden. Es ist von wesentlicher Bedeutung, daß die Röhren erst einige Zeit nach dem Erlöschen des Feuers eingetaucht werden, da die Wärme mehrere Minuten benötigt, um sich über den ganzen Boden des Gefäßes

gleichmäßig zu verteilen. Ein weiterer Vorteil ist es, daß die so hergestellten Eiweißröhren weichgekocht sind und daher bedeutend verdauungsfähiger sind als die gewöhnlich hergestellten hartgekochten Röhren; außerdem sind sie im Gegensatz zu diesen gewöhnlich schön koaguliert und ganz frei von Löchern im Eiweiß. Der wesentlichste Vorzug ist aber der, daß das Verfahren zur Standardierung der Eiweißröhren gebraucht werden kann.

Die zweite Schwierigkeit, konstante Eiweißröhren zu erhalten, ist die Verschiedenheit des Hühnereiweißes. Wenn es sich nur darum handelt, eine einzelne Partie von Röhren für wissenschaftliche Versuche herzustellen, dann ist die Sache sehr einfach; in diesem Falle kann man wie Nirenstein und Schiff das Eiweiß mehrerer Eier zusammenrühren, durch Gaze oder Leinwand filtrieren und dieses vollständig gleichartige Filtrat zum Füllen der Röhren verwenden. Ist aber diese Serie von Röhren verbraucht, so wird es in der Regel nicht möglich sein, neue Röhren von derselben Verdaulichkeit herzustellen, selbst wenn man ganz dieselben Temperaturverhältnisse bei der Koagulation beobachtet. Dieser Umstand ist natürlich von verhängnisvoller Bedeutung für die Verwendbarkeit dieser Methode in der Klinik, und er wird deshalb auch von den Gegnern dieser Methode stark betont. Wie groß diese Verschiedenheiten sind, zeigen die folgenden Versuche: 6 Capillarröhren werden mit gepeitschtem und filtriertem Eiweiß von 6 verschiedenen Eiern gefüllt. Diese 6 Röhren werden zur selben Zeit bei 88° ins Wasserbad gelegt und bleiben bis zur Abkühlung darin liegen. Das Ergebnis war folgendes: 4,3 mm, 4,9 mm, 5,0 mm, 5,2 mm, 5,7 mm und 6,3 mm. In einem Versuch mit 6 anderen bei 90° koagulierten Eiweißröhren, deren Eiweiß gleichfalls von verschiedenen Eiern herrührte, waren die Resultate die folgenden: 10,4 mm, 11,8 mm, 12,3 mm, 10,9 mm, 12,6 mm und 13,2 mm[1]).

Die Differenzen zwischen den einzelnen Eiern sind, wie die Versuche zeigen, mitunter klein, mitunter aber groß; da

[1]) Von denselben Eiern wurden Eiweißröhren bei 80° koaguliert, wobei sich ergab: 16,9 mm, 18,5 mm, 18,5 mm, 14,9 mm, 16,9 mm und 17,0 mm.

sie aber im voraus unberechenbar sind, so beeinträchtigen sie in hohem Grade die Genauigkeit der Methode.

Um diese Schwierigkeit zu überwinden, kann man eine Standardierung mittels verschiedener Temperatureinwirkung während des Koagulationsprozesses vornehmen, und dazu ist die eben beschriebene Technik sehr bequem zu verwenden. Wir hätten z. B. ein Eiweiß, das, bei 85° koaguliert, eine stärkere bzw. schwächere Verdaulichkeit aufweist als die in einem früheren Versuch verwendeten und gleichfalls bei 85° koagulierten Eiweißröhren, die uns als Standard dienen sollen; wir können dann möglicherweise diese letztere Verdaulichkeit dadurch erreichen, daß wir die Röhren bei einer höheren oder niedrigeren Temperatur als 85° ins Wasserbad bringen. Das Verfahren muß also das folgende sein: Es ist die Aufgabe, eine neue Serie von Röhren von der gleichen Verdaulichkeit wie die einer früheren Serie, die als Standard dienen soll, herzustellen. Zu diesem Zwecke peitscht und filtriert man das Eiweiß und saugt etwas von diesem in 11 Röhren ein, deren jede ca. 40 cm mißt. Der Rest des Eiweißes wird bis zum nächsten Tag im Eisschrank aufbewahrt. Nun wird das Wasserbad mit einer bestimmten Wassermenge gefüllt, bis zum Kochen erwärmt, umgerührt und zur spontanen Abkühlung stehen gelassen. Wenn die Temperatur 90° erreicht hat, wird das erste Rohr eingetaucht, bei 89° das zweite und so weiter fort, bis alle 11 Röhren auf dem Boden des Wasserbades in bestimmter Ordnung hingelegt worden sind, so daß eine Verwechslung nicht geschehen kann. Nach der Abkühlung werden alle Röhren in derselben Ordnung herausgenommen; von jeder werden 3 Stückchen (ca. 2 cm lang) abgeschnitten und in je 11 Fläschchen, auf denen die betreffenden Temperaturen von 90, 89 usw. bis 80° vermerkt sind, gebracht. In einer zwölften Flasche befinden sich die Standardröhrchen. Alle 12 Flaschen sind vorher mit ca. 10 ccm einer pepsin- und salzsäurehaltigen Lösung (Magensaft oder künstliches Pepsin) versehen und werden jetzt zur Verdauung in den Thermostaten gestellt.

Nach Verlauf von 24 Stunden wird abgelesen, wie viele Millimeter von einem jeden der Röhrchen verdaut sind, und die Durchschnittszahl der drei Ablesungen von je einer Flasche

bestimmt und das Resultat, das dem Werte des Standardröhrchens am nächsten ist, notiert. Entspricht dieses z. B. den Röhrchen, die bei 88° eingetaucht wurden, dann werden 25 bis 30 Röhren mit dem Eiweiß von dem vorhergehenden Tag gefüllt und im Wasserbad bei 88° eingetaucht. Eine erneute Kontrolle zeigt dann, ob die Standardierung gelungen ist oder nicht. Man kann z. B. leicht einen Temperaturfehler von $^1/_2$° begehen, und zwar besonders deswegen, weil durch das Eintauchen einer größeren Menge von Röhren die Temperatur des Wasserbades etwas herabgesetzt wird; es empfiehlt sich daher, gewöhnlich die Röhren bei einer um ca. $^1/_2$° höheren Temperatur als der beabsichtigten einzutauchen.

Man muß also darauf vorbereitet sein, daß die Standardierung nicht immer gleich gelingt, und es ist daher hierzu oft viel Sorgfalt und Geduld nötig, da man die Röhren nicht eher verwenden darf, bevor nicht die Übereinstimmung eine vollständige ist. Es ist aber unzweifelhaft die einzige Methode, mit der man die Verschiedenheit der Eiweiße beseitigen und untereinander vergleichbare Resultate erhalten kann. Außerdem kann eine Serie von Röhren sehr lange Zeit ohne Veränderung aufbewahrt werden, wenn ein jedes Rohr an beiden Enden mit Lack verschlossen wird, so daß eine Standardierung auf einer medizinischen Abteilung nur ca. 2 mal des Jahres nötig ist; die Ausführung einer Standardierung nimmt bei ein paar Stunden täglicher Arbeit höchstens 2 bis 3 Tage in Anspruch[1]).

Im folgenden soll ein Beispiel der beschriebenen Standardierung gegeben werden:

Röhren, dargestellt									
bei	86	85	84	83	82	81	80	79	78° C
verdaute . . .	9,5	9,9	10,2	10,4	10,5	10,9	10,8	10,9	12,5 mm

Die Standardröhre zeigte 10,3 mm, und die Zahlen, die diesem Werte am nächsten liegen, entsprechen also den zwischen 83° und 84° hergestellten Eiweißröhren. Die neuen Röhren wurden daher bei 84° in das Wasserbad eingetaucht und zeigten gute Übereinstimmung mit dem Standardröhrchen.

[1]) Werden z. B. auf einmal 50 Röhren von je 40 cm Länge hergestellt, so ist dies genügend Material für 500 Pepsinbestimmungen, wenn man für jede Bestimmung 2 Röhrchen à 2 cm verbraucht.

Es hat sich als am praktischsten erwiesen, 85° als Ausgangspunkt der Herstellung zu verwenden; als Verdauungslösung wurden gewöhnlich 0,3% Armours Pepsin in $^{n}/_{10}$-HCl, das ca. 10 bis 15 mm in 24 Stunden verdaut, verwendet. Die Standardierung neuer Röhren ist als gelungen zu betrachten, wenn der Unterschied zwischen der Verdauung dieser letzteren und der Standardröhre 0,3 mm nicht überschreitet, welches den durchschnittlichen Ablesungsfehler bei drei Röhren in derselben Lösung ausmacht.

Auf diese Weise sind die zwei wesentlichsten technischen Einwände gegen Metts Methode durch das verwendete Verfahren aufgehoben worden, indem die eine Fehlerquelle dazu benützt wurde, um die andere zu beseitigen.

Von den übrigen Einzelheiten der Technik soll folgendes bemerkt werden: Zur Verwendung gelangten dünnwandige Capillarröhren, deren innerer Durchmesser zwischen 0,9 und 1,5 mm schwankte.

Innerhalb dieser Grenzen spielt die Weite der Röhrchen keine Rolle für die Verdauung; dagegen haben dünne Eiweißröhren mit einem Durchmesser, der kleiner ist als 1 mm, eine etwas geringere Verdaulichkeit, wie aus dem folgenden Versuch ersichtlich ist: 24 Röhren von ca. 2 cm Länge und von verschiedener Weite werden in 8 Flaschen mit derselben Pepsinmenge gebracht. Nach der Verdauung wird das verdaute Stückchen und der innere Durchmesser von jedem einzelnen Rohr gemessen. Die Resultate waren, in Durchschnittszahlen angegeben, die folgenden:

Durchmesser in mm	0,6—0,7	0,8—0,9	1—11	12—13	14—15
Verdauung in mm . .	12,7	13,8	13,7	13,6	13,6

Der Versuch zeigt, daß Eiweißröhrchen, deren Durchmesser kleiner als 0,8 mm ist, für ganz exakte Versuche wenigstens, nicht verwendbar sind. Für klinischen Gebrauch hingegen spielt dieser Unterschied der Verdaulichkeit keine große Rolle, und es wird daher in diesem Falle kaum nötig sein, den inneren Diameter der Röhren zu messen; dagegen muß man natürlich für die Standardierung Röhren mit einem Durchmesser von mehr als 0,8 mm auswählen.

Die Aufbewahrung der Röhren geschieht, wie früher

erwähnt, durch Verschließung beider Enden mit Lack; dies muß mit großer Sorgfalt ausgeführt werden, da sonst das Eiweiß langsam eintrocknen würde; gut verschlossene Röhren können wenigstens ein halbes Jahr hindurch unverändert aufbewahrt werden. Für Verdauungsversuche werden mittels eines Glasmessers 2 bis 3 Stückchen, ein jedes von ca. 2 mm Länge, abgeschnitten und sofort in ca. 10 ccm der Verdauungslösung eingetaucht; die Menge der letzteren ist übrigens gleichgültig. Als Verdauungsgefäße wurden immer kleine Flaschen mit flachem Boden und weitem Hals benutzt. Die Röhren werden horizontal auf den Boden gelegt und die Flasche mit Korkstöpseln gut verschlossen, um Verdunstung zu vermeiden. Bevor die Flaschen in den Thermostaten hineingestellt werden, müssen eventuelle Luftblasen an den Enden der Röhren durch kräftiges Schütteln entfernt werden; dagegen darf man während der Verdauung die Flaschen nicht schütteln.

Die Temperatur des Thermostaten muß so konstant wie möglich sein, da Metts Methode für Temperaturschwankungen sehr empfindlich ist. In einem Versuche, wo drei Thermostaten auf 33°, bzw. 37 und 40° eingestellt worden waren, ergaben sich für 6 verschiedene Verdauungslösungen in 24 Stunden die folgenden Resultate:

	33°	37°	40°
1.	12,8 mm	17,5 mm	21,3 mm
2.	11,4 "	14,3 "	16,2 "
3.	—	6,3 "	8,3 "
4.	—	4,9 "	6,4 "
5.	—	5,2 "	6,9 "
6.	—	3,5 "	4,8 "

Man wird also mit dieser Methode schon kleine Temperaturunterschiede sehr deutlich bemerken können.

Die Ablesung geschieht mit dem bloßen Auge oder mit einer Lupe mit Hilfe eines Millimetermaßstabes, der in halbe Millimeter eingeteilt ist. Die in den Versuchen angeführten Zahlen bedeuten immer (wie in den meisten russischen Arbeiten) die Differenz zwischen der Länge des Röhrchens und der des unverdauten Eiweißstückchens (im Gegensatz zu Nirenstein und Schiff, die die halben Zahlen verwenden). Es wurden immer

die Durchschnittszahlen der Ablesungen der drei Röhren einer jeden Flasche genommen.

Der Ablesungsfehler ist für Längen, kleiner als 10 mm, durchschnittlich 0,2 bis 0,3 mm, niemals über 0,5 mm. Für größere Rohrlängen kann der Fehler etwas größer sein. Die Genauigkeit ist für käufliches Pepsin (gewöhnlich Schweinepepsin) größer als für menschliches Pepsin, indem die Grenze im ersten Falle sehr scharf, im letzten Falle dagegen immer etwas verschwommen erscheint.

Die hiermit abgeschlossene Beschreibung der Versuchstechnik erscheint vielleicht ziemlich detailliert; die Methode erfordert aber trotz ihrer anscheinenden Einfachheit eine nicht geringe Sorgfalt in der Ausführung, die ihr nicht immer zuteil geworden ist.

Das Prinzip der Methode.

Im folgenden sollen die Einwände gegen das Prinzip der Methode selbst behandelt werden. Diese laufen im wesentlichen auf die Betonung des Umstandes hinaus, daß in der Tiefe der Capillarröhrchen nicht dieselben Verhältnisse wie in der umgebenden Lösung vorhanden sind. Sowohl die Pepsin- wie die Salzsäurekonzentration sind nach der Ansicht dieser Verfasser innerhalb des Röhrchens angeblich kleiner als außerhalb desselben, während die gebildeten Verdauungsprodukte innerhalb des Röhrchens stagnieren und hemmend auf die Verdauung wirken. Die Verdauung bei der Mettschen Methode wäre demnach nicht allein von der Salzsäure- und Pepsinkonzentration, sondern auch von schwierig zu berechnenden Diffusionsverhältnissen abhängig. Der Klarheit wegen wollen wir bei Betrachtung dieser Einwände die Diffusion der Salzsäure und die Diffusion des Pepsins gesondert behandeln.

Was die Salzsäure anbetrifft, so ist es sehr leicht, die Diffusionsgeschwindigkeit unter Verhältnissen, die den vorliegenden einigermaßen entsprechen, zu untersuchen. Die Verdauung überschreitet bei der Mettschen Methode sehr selten 20 mm, also 10 mm von jeder Seite des Röhrchens. Es handelt sich also darum, zu konstatieren, ob die Diffusionsgeschwindigkeit der Salzsäure eine derartige ist, daß die Wasserstoffionenkonzentration in der Tiefe von 10 mm nicht wesentlich von

jener an der Öffnung des Röhrchens abweicht. Das Medium, durch welches die Salzsäure bei der Mettschen Methode diffundiert, ist ja eine peptonreiche wässerige Lösung; da es indessen schwierig ist, die Diffusionsverhältnisse in Lösungen zu studieren, so wird für solche Versuche gewöhnlich verdünntes Agar oder Gelatine verwendet, worin die Diffusion ebenso schnell wie in Lösungen vor sich geht: 1% Agar wurde mit Kongorot (1%) gefärbt, in Capillarröhrchen eingefüllt und zusammen mit Mett-Röhrchen in Verdauungslösungen gebracht. Die Diffusion der Salzsäure war dabei an der Blaufärbung des rotgefärbten Agars sehr deutlich zu erkennen. Bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß die Strecke, in die die Salzsäure nach dem Verlaufe von 24 Stunden in das Agarröhrchen hinein diffundierte, gewöhnlich etwa 10 mal so lang war als das von Pepsin und Salzsäure verdaute Stückchen Eiweiß. Es ist aus der Physik bekannt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit der Quadratwurzel aus Zeit und Konzentration proportional ist; infolgedessen ist die Diffusion verdünnter Lösungen schwächer, aber trotzdem noch genügend schnell. So diffundierte $^{n}/_{100}$ freie Salzsäure in 24 Stunden 60 mm weit in das 1%ige Agar, während die stärkste Verdauung, die ich bei dieser Salzsäurekonzentration[1]) beobachtet habe, 12 mm ausmacht. Dazu kommt noch der Umstand, daß die Salzsäurekonzentration innerhalb des Stückchens, in welches die Salzsäure diffundiert ist, nicht gleichmäßig abnimmt, da die erste Strecke sehr schnell, die letzte sehr langsam passiert wird. Innerhalb der ersten 10 mm, die ungefähr dem Maximum der in 24 Stunden möglichen Verdauung entsprechen, wird demnach die Salzsäurekonzentration annähernd dieselbe sein wie in der umgebenden Lösung. Man kann auch mit den Eiweißröhren selbst Diffusionsversuche anstellen, indem man das Eiweiß, bevor es in die Röhren eingesaugt und koaguliert wird, mit Methylorange oder Lackmus färbt (Kongopapier kann man hierzu nicht verwenden). In

[1]) Johanne Christiansen, diese Zeitschr. 46, 24, 50, 71 u. 82, 1912. Die in dieser Arbeit erwähnten Konzentrationen freier Salzsäure wurden durch Titration mittels des Günzburgschen Reagens bestimmt. Diese Titrationen ermöglichen nämlich eine sehr genaue Bestimmung der freien Salzsäure und entsprechen auch sehr gut den elektrometrisch gefundenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

einem solchen Versuche mit lackmusgefärbtem Eiweiß wurden im Laufe eines Tages 10 mm verdaut, während die Salzsäure außer in diese 10 mm noch 21 mm weiter in das feste Eiweiß, also im ganzen 31 mm weit, hineindiffundiert war. Die Diffusion in einem gleichzeitigen Versuche mit 1°/₀igem Agar betrug ungefähr 100 mm, war also bedeutend schneller als in dem koagulierten Eiweiß. Diese Versuche machen es in hohem Grade wahrscheinlich, daß die Diffusion der Salzsäure genügend schnell vor sich geht, wenn auch ein direkter Beweis naturgemäß nur schwierig zu erbringen ist.

Anders verhält es sich mit der Diffusion des Pepsins, bei der man die Geschwindigkeit nicht direkt beobachten kann. Aber selbst wenn auch das Pepsin sehr langsam diffundieren würde, so wäre dies trotzdem kein Argument für die Unbrauchbarkeit der Mettschen Methode. Da nämlich die Diffusion des Pepsins mit dessen Konzentration notwendigerweise steigen muß, so würde ein Unterschied zwischen den verdauten Rohrlängen in allen Fällen einem Unterschied der Pepsinmenge entsprechen. Würde hingegen die Diffusion eine Hauptrolle spielen, so würde man keine von ihr unabhängigen Gesetze der Pepsinwirkung finden können, und die wissenschaftliche Bedeutung der Methode wäre daher bedeutend geringer.

Um zu erfahren, welche Rolle die Diffusion spielt, muß man untersuchen, inwieweit die Verdauung bei der Mettschen Methode den Gesetzen, die für die Diffusion anderer Stoffe gelten, gehorcht, d. h. ob sie der Quadratwurzel aus Zeit und Konzentration proportional verläuft. Nur wenn diese beiden Bedingungen von der Mettschen Methode erfüllt werden, kann man die Diffusion des Pepsins als einen bedeutungsvollen Faktor betrachten. Es verhält sich indessen, wie die folgenden Versuche zeigen werden, so, daß die Verdauung bei der Mettschen Methode nur die eine dieser Forderungen erfüllt; die Verdauung ist zwar der Quadratwurzel der Pepsinmenge ungefähr proportional (Schütz' Gesetz), sie ist aber nicht der Quadratwurzel der Zeit proportional, sondern zeigt mit dieser letzteren eine beinahe vollständige direkte Proportionalität.

Werden z. B. in den ersten Stunden 2 mm verdaut, so wird in 24 Stunden das Vierfache, also 8 mm, verdaut, während

dem Diffusionsgesetze nur das Doppelte, nämlich 4 mm in 24 Stunden, entsprechen würde.

Diese Tatsache ist schon von früheren Autoren (u. a. Linossier, Nirenstein und Schiff) hervorgehoben worden; da ihre Richtigkeit aber nichtsdestoweniger häufig bestritten wird und größere zahlenmäßige Angaben darüber fehlen, so wird es nötig sein, diese Untersuchungen zu wiederholen, da diese Frage für die Taxierung der Mettschen Methode von großer Wichtigkeit ist.

Tabelle I.

Verdauung in 6, 12, und 24 Stunden.

Nr.	Pepsin %	Günzburg-Zahl	6 Std.	12 Std.	24 Std.	Ber. I in 24 Std.	Ber. II in 24 Std.
1	A. 0,25	11	1,1	2,6	4,7	4,4	2,2
2	P. D. 1,0	16	3,2	6,0	11,0	12,8	6,4
3	„ 0,5	20	2,8	5,5	10,3	11,2	5,6
4	A. 0,5	21	2,6	5,3	10,5	10,4	5,2
5	P. D. 0,25	23	2,1	4,1	8,9	8,4	4,2
6	„ 0,12	24	1,7	3,9	7,6	6,8	3,4
7	„ 0,06	25	1,3	2,8	5,6	5,2	2,6
8	M. —	25	2,1	4,5	8,3	8,4	4,2
9	„ —	25	2,8	5,4	10,1	11,2	5,6
10	„ —	26	3,2	6,8	13,2	12,8	6,4
11	„ —	27	4,0	8,8	16,3	16,0	8,0
12	„ —	30	5,2	10,0	17,6	20,8	10,4
13	A. 0,05	41	1,9	3,7	7,3	7,6	3,8
14	„ 0,1	41	2,3	4,7	9,3	9,2	4,6
15	„ 0,2	41	3,2	6,1	11,7	12,8	6,4
16	„ 1,0	41	4,9	9,4	18,2	19,6	9,8
17	„ 1,0	80	5,6	11,9	21,4	22,4	11,2
18	P. D. 1,0	80	5,0	9,2	17,9	20,0	10,0
19	„ 0,2	96	2,9	5,8	10,1	11,6	5,8
20	„ 0,1	98	2,1	4,3	8,1	8,4	4,2
21	A. 0,5	98	4,2	8,0	14,8	16,8	8,4
22	„ 0,75	110	4,8	9,7	18,2	19,2	9,6
23	M. —	125	3,2	6,8	10,8	12,8	6,4
24	A. 0,5	140	4,0	7,4	13,5	16,0	8,0
25	M. —	160	2,3	4,3	7,2	9,2	4,6
26	„ —	180	1,5	2,9	4,8	6,0	3,0
27	A. 0,9	180	4,5	8,5	14,4	18,0	9,0
28	„ 1,0	190	3,9	7,2	12,5	15,6	7,8
29	„ 0,45	190	3,3	6,5	11,3	13,2	6,6
30	M. —	190	1,0	1,9	3,6	4,0	2,0
31	„ —	195	0,7	1,4	2,5	2,8	1,4
32	A. 0,2	195	2,2	3,4	6,7	8,8	4,4
33	„ 0,1	197	1,7	2,9	5,3	6,8	3,4
34	„ 0,05	200	1,2	2,3	4,0	4,8	2,4

In der Tabelle I bedeutet A. Armours Pepsin, P. D. Parke-Davis' Pepsin, M. das Filtrat des Mageninhaltes vom Menschen, das in verschiedenen Verdünnungen benutzt wurde ($^1/_2$ bis $^1/_{32}$). Die Zahlen der beiden letzten Kolonnen geben die einerseits nach der direkten Proportionalität mit der Zeit (Ber. I), andererseits die nach dem Diffusionsgesetz, d. h. nach der Proportionalität mit der Quadratwurzel der Zeit (Ber. II) berechneten Zahlen an. In beiden Fällen ist die Verdauung nach 6 Stunden zum Ausgangspunkt der Berechnung genommen worden, wobei natürlich die Fehler dieser Bestimmungen zwei- bzw. vierfach vergrößert werden. Wird der Durchschnittsfehler der Bestimmung nach 6 Stunden auf 0,25 mm geschätzt, dann wird also der Fehler der berechneten Zahl (I) $4 \times 0{,}25 = 1$ mm sein.

Vergleicht man die beobachteten Zahlen mit den berechneten, dann zeigt es sich, daß die nach 24 Stunden beobachtete Verdauung mit der ber. I viel besser als mit der ber. II übereinstimmt, d. h. es wird in 24 Stunden mit großer Annäherung viermal soviel wie in 6 Stunden verdaut. Dies deutet darauf hin, daß sowohl die Diffusion der Salzsäure wie auch des Pepsins viel schneller als die Verdauung des Eiweißes verläuft und daß also die Diffusionsgesetze für die für die Mettsche Methode geltenden Gesetze nicht bestimmend sein können.

Eine nähere Betrachtung der Abweichungen zwischen den beobachteten und den berechneten Zahlen (I) für 24 Stunden zeigt jedoch, daß der Diffusion eine ganz geringe Bedeutung zukommt.

Diese Abweichung ist nämlich in den allermeisten Fällen (26 von 34) negativ, d. h. die beobachteten Zahlen sind etwas kleiner als die berechneten; der Unterschied variiert zwischen 0,1 und 3,6 mm. Die Ursache dieser Differenz ist unzweifelhaft teilweise in einer mangelhaften Diffusion gelegen; es gibt aber noch eine zweite Beziehung, der man eine viel größere Bedeutung zuschreiben muß. Die Versuche zeigen nämlich, daß der Unterschied zwischen den berechneten (I) und den beobachteten Zahlen mit der Säurekonzentration, die durch Titrierungszahlen des Günzburgreagens als Indicator ausgedrückt ist, deutlich ansteigt. Werden erst die Versuche 1 bis 12, deren Acidität zwischen den Günzburgzahlen 11 bis 30 liegt, betrachtet, dann sieht man, daß die

Abweichungen in 7 Fällen positiv (und zwar alle kleiner als 0,8 mm), und nur in 5 Fällen negativ (zwischen 0,1 und 2,8 mm variierend) sind. Die durchschnittliche Abweichung ist — 0,3 mm.

In den Versuchen 13 bis 21, deren Acidität zwischen 41 und 98 liegt, sind die Abweichungen alle mit einer Ausnahme (Nr. 14) negativ (zwischen 0,3 und 2,1 mm variierend). Die durchschnittliche Abweichung ist ÷1,1 mm.

In den Versuchen 22 bis 34, deren Acidität zwischen 110 und 200 liegt, sind sämtliche Abweichungen negativ (zwischen 0,3 und 3,6 mm variierend), und die durchschnittliche Abweichung ist — 1,7 mm.

Wird die Größe der Abweichung in prozentischem Verhältnis zu den verdauten Millimeter ausgedrückt, dann ist die Reihenfolge ebenfalls dieselbe; für die niedrigen Aciditäten zwischen 11 und 30 ist sie durchschnittlich 3%, für Aciditäten zwischen 41 und 98 4%, und für Aciditäten zwischen 110 und 200 16%.

Hierdurch erklären sich die widersprechenden Angaben verschiedener Verfasser. Linossier und Nirenstein und Schiff, die mit Aciditäten von 0,1 bis 0,2% (den Günzburgzahlen 28 bis 55 entsprechend) arbeiteten, fanden nämlich, daß die Verdauung vollständig proportional mit der Zeit verläuft; dagegen finden Samojloff und andere russische Verfasser, die mit reinem Hundemagensaft von einer Acidität 0,5 bis 0,6% (was den Günzburgzahlen 139 bis 167 entspricht) arbeiteten, daß die Proportionalität nur für die ersten 10 Stunden eine vollständige ist, und sie empfehlen daher, die Versuchszeit nicht über diese Grenze auszudehnen.

Dieser eigentümliche Einfluß der Salzsäure auf das Verhältnis der Verdauung zur Zeit findet dadurch seine Erklärung, daß Salzsäure bei längerer Einwirkung tötend auf das Pepsin einwirkt. Daß dieses wirklich der Fall ist, wurde von P. Liebmann und Johannesen[1]) durch den folgenden Versuch bewiesen: Mehrere Pepsinlösungen mit gleichem Pepsingehalt, aber verschiedener Säurekonzentration wurden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; zu verschiedenen Zeiten wurde dann die peptonisierende Kraft dieser Lösungen, die vorher auf die gleiche Säurekonzentration gebracht wurden,

[1]) P. Liebmann und L. Johannesen, Ugeskrift for Läger. **1911**, Nr. 25.

mittels des Liebmannschen Peptometer gemessen. Es zeigte sich, daß eine wässerige Pepsinlösung 14 Tage hindurch unverändert blieb; eine Pepsinlösung in ca. $^{n}/_{10}$-HCl hatte sich im Laufe von 14 Tagen von 277 auf 177 „Pepsineinheiten“ und eine Pepsinlösung in ca. $^{n}/_{5}$-HCl von 277 auf 120 „Einheiten“ verringert. Stärkere Salzsäurekonzentrationen haben eine noch mehr schwächende Einwirkung auf das Pepsin.

Analoge, mit Metts Methode durchgeführte Versuche bestätigen vollauf Liebmanns Untersuchungen, wie das folgende Beispiel lehrt.

Es wurden 5 Lösungen von 0,5 % Armours Pepsin hergestellt und mit verschiedenen Mengen freier Salzsäure versetzt, so daß die Konzentrationen 0, $^{n}/_{40}$, $^{n}/_{20}$, $^{n}/_{10}$ und $^{n}/_{5}$ resultierten (die durch Günzburgtitrierung bestimmt wurden); diese Lösungen wurden in den Thermostaten bei 37° gestellt. Nach Ablauf verschiedener Zeiten wurden Proben genommen, auf dieselbe Salzsäure- und Pepsinkonzentration ($^{n}/_{10}$-HCl und 0,25 % Pepsin gebracht, und die peptonisierende Kraft derselben mit Hilfe der Mettschen Methode (24stündige Einwirkung bei 37°) bestimmt.

Tabelle II.

	Konzentration freier Salzsäure				
	0	$^{n}/_{40}$	$^{n}/_{20}$	$^{n}/_{10}$	$^{n}/_{5}$
Verdaute mm					
gleich	12,6	12,6	12,6	12,6	12,6
nach 1 Tage . . .	12,2	12,0	12,0	11,6	9,2
„ 3 Tagen . .	10,3	11,3	10,8	9,7	7,4
„ 10 „ . .	7,2	9,5	9,2	6,4	4,5
„ 18 „ . .	—	7,2	6,0	3,7	1,7
„ 30 „ . .	—	6,9	5,3	2,6	0,5
„ 68 „ . .	—	4,0	2,3	0,2	0
„ 100 „ . .	—	2,5	1,2	0	0

Die Pepsinlösung, die sich am besten gehalten hatte, war in diesem Versuche nicht die wässerige Lösung, sondern die mit der Salzsäurekonzentration $^{n}/_{40}$. Die Ursache hierzu lag wahrscheinlich in dem Umstand, daß die wässerige Lösung sehr schnell verfaulte, da Antiseptica nicht zugesetzt waren. Der Versuch zeigt übrigens ebenso wie der von Liebmann, daß die Schwächung um so schneller vor sich geht, je stärker die verwendete Salzsäurekonzentration ist. Bei der Konzen-

tration $^{n}/_{5}$-HCl ist die Schwächung schon nach einem Tage stark ausgesprochen, und es ist daher leicht erklärlich, daß die Verdauung in so starker Salzsäure nicht proportional mit der Zeit vor sich gehen kann (siehe Tabelle I).

Auch in kurzdauernden Zerstörungsversuchen kann die schwächende Wirkung der Salzsäure auf Pepsin deutlich demonstriert werden, wie aus dem folgendem Versuche hervorgeht:

Drei Pepsinlösungen mit denselben Pepsinkonzentrationen, aber verschiedener Acidität (0, 16 und 57, ausgedrückt in Günzburgzahlen) werden im Laufe einer Stunde auf dem Wasserbad langsam erwärmt. Nachdem die Temperatur auf 55° bzw. 60 und 65° gestiegen ist, werden die Proben herausgenommen und auf dieselbe Säurekonzentration gebracht, worauf die peptonisierende Kraft wie gewöhnlich durch 24stündige Verdauung bei 37° bestimmt wird. Die Resultate waren, in Millimeter ausgedrückt, die folgenden:

Tabelle III.

	Proben herausgenommen bei		
	55°	60°	65°
Verdaute mm			
bei einer Acidität 0	13,2	13,0	12,2
" " " 16	12,1	11,8	1,8
" " " 57	10,3	5,8	0

Der Versuch zeigt, daß die Pepsinlösung, deren Acidität am stärksten war (57), unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei 65° vollständig getötet wurde, während die wässerige Pepsinlösung sehr wenig gelitten hatte. Ähnliche Versuche mit verschiedener Erwärmungszeit und verschiedenen Pepsin- und Säurekonzentrationen ergaben ganz dasselbe Resultat, nämlich den außerordentlich starken Einfluß der Säurekonzentration auf die Zerstörungstemperatur. Es ist aber überflüssig noch mehr Versuche zu beschreiben, da auch diese Liebmanns Resultate vollständig bestätigten.

Die unvollständige Proportionalität der Verdauung mit der Zeit bei hohen Aciditäten muß also der schädigenden Wirkung der Salzsäure auf das Pepsin zugeschrieben werden; dieses Verhältnis besteht

aber nicht allein für die Mettsche Methode, sondern gilt ebenso auch für die anderen Methoden. Dagegen verursacht die Diffusion des Pepsins, wie schon oben erwähnt, einen kleinen Fehler, der für Metts Methode spezifisch ist. Dieser Fehler der übrigens von dem durch die Säureschädigung des Pepsins hervorgerufenen Fehler schwierig zu unterscheiden ist, kann doch jedenfalls kaum 5% überschreiten und hat also keine größere Bedeutung.

Hiermit ist die Besprechung der Einwände gegen die Mettsche Methode, soweit sie sich auf die Diffusionsverhältnisse der Salzsäure und des Pepsins beziehen, abgeschlossen.

Es gibt noch einen dritten Einwand gegen die Mettsche Methode, der sich gegen deren praktische Verwertbarkeit richtet. Das Schützsche Gesetz hat nämlich nur innerhalb der ersten 8 verdauten Millimeter Geltung, so daß man für größere Rohrlängen dieses Gesetz nicht zur Berechnung der entsprechenden relativen Pepsinmengen benutzen kann. Dieser Einwand wird auch von Nirenstein und Schiff akzeptiert, indem diese Verfasser hervorheben, daß es bei der starken Verdünnung des Mageninhaltes (1/16), die sie anwenden, ein Vorzug ist, daß die Verdauung dabei niemals 8 mm (d. h. 4 mm von jeder Seite des Röhrchens) überschreitet.

Eine Kritik auf dieser Grundlage ist indessen wenig gerechtfertigt, da es für die Verwendung der Methode vollständig genügt, wenn sich eine entsprechende Kurve der Abhängigkeit zwischen den verdauten Rohrlängen und den Pepsinkonzentrationen aufstellen läßt. Ob nun diese Kurve mit einer bestimmten Formel Übereinstimmung zeigt, ist eine ganz andere Sache. Übrigens gibt es keine Pepsinmethode, die eine bessere Übereinstimmung mit dem Schützschen Gesetz zeigen würde als eben die Mettsche Methode. Die tatsächlich vorhandenen kleinen Abweichungen von diesem Gesetz finden wahrscheinlich durch den eben erwähnten Einfluß der Diffusion und der Säureschädigung des Pepsins ihre einfache Erklärung.

Schließlich soll noch kurz erwähnt werden, daß Arrhenius[1]) der Mettschen Methode vorwirft, daß sie für Versuche über die Gesetze der Pepsinwirkung nicht verwertbar sei. Er schreibt

[1]) Arrhenius, Immunochemie 1907.

nämlich S. 80: „Es muß betont werden, daß Versuche mit Mettschen Röhren nicht zur Entscheidung dieser Frage verwandt werden können. Denn die Diffusionsgeschwindigkeit kommt dabei neben der chemischen Reaktion zur Geltung, und wenn die Diffusion der langsamere der beiden Vorgänge ist, so bewirkt sie, daß die Verdauung proportional zur Quadratwurzel aus Zeit und Konzentration fortschreitet.“

Dieses Urteil stützt sich also vor allem auf die Vermutung, daß die Diffusion des Pepsins so langsam vor sich geht, daß dadurch die Verdauung gehindert wird, so daß das Schützsche Gesetz der Pepsinwirkung zum altbekannten Gesetz der Diffusion reduziert wird.

Es geht indessen aus den früher erwähnten Versuchen hervor, daß die Diffusion diese große Rolle nicht spielen kann. Man muß im Gegenteil der Mettschen Methode eine besondere Entscheidungsfähigkeit in diesen Fragen zuschreiben, da sie die wichtigste Eigenschaft eines katalytischen Prozesses, nämlich seinen (bei konstantem Substrat) mit der Zeit proportionalen Verlauf, nachzuweisen gestattet.

Im folgenden soll ein mehr spezielles Verhältnis, das bei Pepsinbestimmungen im menschlichen Mageninhalt sehr wichtig ist, nämlich der Einfluß hemmender Stoffe auf die Pepsinwirkung, näher untersucht werden.

Die Hemmung der Pepsinwirkung.

Nirenstein und Schiff sind die ersten gewesen, die die große Bedeutung der Hemmung der Pepsinwirkung im Mageninhalt hervorgehoben haben. Sie wiesen nämlich nach, daß Mageninhalt, mit Salzsäure von derselben Stärke verdünnt, oft mehr oder ebensoviel wie in unverdünntem Zustand verdaute. Ein Beispiel aus dem Versuchsmaterial Nirensteins und Schiffs (Nr. 1) wird dieses Verhältnis illustrieren: Ein Mageninhalt mit $1^0/_{00}$ freier Salzsäure verdaute unverdünnt 4,2 mm. Bei der Verdünnung 1/2 und bei gleicher Säurekonzentration betrug die Verdauung 5,95 mm; bei der Verdünnung 1/4 6,4 mm, und bei der Verdünnung 1/8 5,6 mm. Der unverdünnte Mageninhalt verdaute also weniger als der 8fach verdünnte, obgleich die Acidität dieselbe war. Nirenstein und Schiff haben

daher vorgeschlagen, wegen der zu starken Hemmung niemals Pepsinbestimmungen im unverdünnten Mageninhalt vorzunehmen, sondern nur bei 16facher Verdünnung; bei dieser Verdünnung ist nämlich die Hemmung nicht mehr wahrnehmbar. Die im Mageninhalt vorhandenen hemmenden Stoffe sind nach Nirenstein und Schiff Chlornatrium, Zucker und Schleim.

Um zu entscheiden in welcher Verdünnung diese Hemmung sistiert ist, benutzten Nirenstein und Schiff ein Verfahren, das auch von Samojloff verwendet worden ist, nämlich eine Verdünnung des betreffenden Mageninhalts, teils mit Salzsäure derselben Acidität, teils mit demselben, aber durch Erhitzen inaktivierten Magensaft. Will man z. B. wissen, ob die Hemmung eines Magensaftes in der Verdünnung 1/8 aufgehoben ist, dann wird ein Teil des so verdünnten Magensaftes durch Erhitzen inaktiviert und zur Verdünnung des nicht inaktivierten Teiles benutzt. Gleichzeitig wird eine zweite Reihe Verdünnungen mit reiner Salzsäure derselben Acidität aufgestellt, und wenn die zwei Serien dieselbe Verdauung zeigen, so kann man sicher sein, daß keine nachweisbare Hemmung bei der betreffenden Verdünnung (1/8) stattfindet.

Die folgende Tabelle betrifft reinen Magensaft (von einem Patient mit Hypersekretion); die Konzentration der freien Salzsäure ist 0,066 n (Günzburgzahl 66). In der ersten Kolonne sind Verdünnungen mit Salzsäure von derselben Acidität, in der zweiten Kolonne Verdünnungen mit inaktiviertem, auf 1/8 verdünntem Magensaft, und in der dritten Kolonne die nach dem Schützschen Gesetze ($y^2 = kx$) berechneten Zahlen angegeben.

Tabelle IV.

	Verdünnung mit 0,066 n-HCl mm	Verdünnung mit inaktiviertem Magensaft mm	Zahlen, nach Schütz' Gesetz berechnet mm
Verdünnung 1 . . .	19,2	—	45,6
„ 1/2 . .	20,2	—	32,8
„ 1/4 . .	17,9	—	22,8
„ 1/8 . .	14,2	14,2	16,4
„ 1/16 .	10,8	10,9	11,4
„ 1/32 .	7,5	7,8	8,2
„ 1/64 .	5,9	5,8	5,7
„ 1/128 .	4,1	4,1	4,1

Die Tabelle zeigt, daß die Hemmung in der Verdünnung 1/8 aufgehoben ist, indem die Unterschiede zwischen den Zahlen der Kolonnen 1 und 2 innerhalb der Fehlergrenze (0,3 mm) liegen. Bei Vergleichung mit der dritten Kolonne sieht man, daß die Abweichung vom Schützschen Gesetz ungefähr bei 8 mm (Verdünnung 1/32) beginnt; sie ist aber in dieser Verdünnung, sowie auch in den Verdünnungen 1/16 und 1/8 nicht größer, als daß sie sich nicht aus den schon erwähnten Abweichungen von der genauen Proportionalität mit der Zeit erklären ließe (Tabelle I). Dagegen haben die großen Abweichungen von dem Schützschen Gesetz in den Verdünnungen 1 bis 1/4 ihre Ursache in der hier stattfindenden starken Hemmung.

Man kann gegen das benutzte Verfahren den Einwand erheben, daß möglicherweise einige von den hemmenden Stoffen durch die Inaktivierung verändert werden, wenn auch dies nicht wahrscheinlich ist. Nirenstein und Schiff versuchten daher, die Gültigkeit des Schützschen Gesetzes als Kriterium dafür zu benutzen, ob Hemmung zugegen ist oder nicht; hierbei ist man aber dazu genötigt, nur Zahlen kleiner als 8 mm zu benutzen, weil Schütz' Gesetz für größere Rohrlängen keine Geltung hat. Dies paßte aber gut zu den Versuchen N.s und S.s, weil bei der Verdünnung 1/16 niemals mehr als höchstens 8 mm von dem von ihnen verwendeten hart gekochten Eiweißröhren verdaut wurde. Andererseits gab dies aber Anlaß zur Kritik (Kaiserling), daß Metts Methode durch N. und S.sche Modifikation an Genauigkeit einbüßte, da die Resultate nur zwischen 0 und 8 mm variierten.

Benützt man aber, wie in vorliegender Arbeit, weich gekochte Eiweißröhren und verdünnt dann mit Salzsäure von optimaler Acidität (Günzburgzahl 30), so erweist sich die Methode als weit empfindlicher, selbst wenn man dieselbe Verdünnung (1/16) wie Nirenstein und Schiff verwendet. Bei diesem Verfahren sind die Pepsinzahlen im Mageninhalt für die nämliche Verdünnung (1/16) 8 bis 12 mm. Schütz' Gesetz wird also in der Regel für diese Zahlen, die doch nicht gehemmt sind, keine vollständige Geltung haben.

Es hat sich indessen in zahlreichen Versuchen gezeigt, daß (wenn keine Hemmung vorhanden ist) die Abweichung von Schütz' Gesetz bei derselben Acidität eine sehr gleichmäßige

ist. So zeigte es sich bei Untersuchung von einer Reihe von Mageninhalten in den Verdünnungen 1/16 und 1/32, daß alle diese Zahlen in demselben relativen gegenseitigen Verhältnis stehen, wenn auch dieses Verhältnis durch das Schützsche Gesetz nicht ausgedrückt werden kann. Auch die Verdünnungen 1/8 und 1/16 zeigen, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, dasselbe gegenseitige Verhältnis, so daß die Hemmung in den meisten Fällen schon in der Verdünnung 1/8 aufgehoben ist. Es ist also möglich, eine Kurve über das Verhältnis zwischen den relativen Pepsinkonzentrationen und der verdauten Anzahl Millimeter aufzuzeichnen, wenn man nur Konzentrationen auswählt, für welche die Hemmung keine Rolle spielen kann. Ich habe teils für stark verdünnten Magensaft von Hunden und Menschen, teils für käufliches (Armours und Parke-Davis) Pepsin derartige Kurven konstruiert und gefunden, daß sie alle demselben Gesetz gehorchen, das für Salzsäurekonzentrationen zwischen $^{n}/_{10}$ und $^{n}/_{20}$ HCl in der Formel $y^{2,45} = kx$ seinen Ausdruck findet. Diese kleine Abweichung vom Schützschen Gesetz ($y^2 = kx$) variiert etwas mit den verschiedenen Aciditäten, wie man dies auch zufolge des schwächenden Einflusses der Salzsäure auf das Pepsin erwarten mußte. Wenn man daher wünscht, die Verdauung in relativen Pepsinzahlen auszudrücken, ist es notwendig, eine empirische Kurve für die betreffende Acidität zu konstruieren und diese dazu zu benützen, die der gefundenen Verdauung (ausgedrückt in Millimeter) entsprechende Pepsinzahl zu finden. Dieses Verfahren hat indessen kaum große Vorzüge, weil ja die gewählte Pepsineinheit doch ganz willkürlich ist und von der Verdaulichkeit der Eiweißröhren, der Acidität, der Temperatur usw. abhängig bleibt.

Es ist nicht einmal möglich eine Einheit zu finden, die, wenn auch alle Versuchsbedingungen die gleichen sind, dazu verwendbar wäre, menschliches Pepsin mit Pepsin anderen Ursprungs zu vergleichen; denn die verschiedenen Pepsinsorten haben, wie es noch später näher erörtert werden soll, nicht immer dasselbe Salzsäureoptimum. Menschliches Pepsin kann bei der Acidität $^{n}/_{40}$ stärkere Wirkung haben als eine Lösung von z. B. Armours Pepsin, das im Gegenteil bei der Acidität $^{n}/_{20}$ das stärkere von beiden ist. Solche Beispiele finden sich in den folgenden Tabellen VI und VII.

Da man doch nur relative Werte angeben kann, genügt es bei der klinischen Verwendung der Mettschen Methode, die Verdauung direkt in Millimeter anzugeben. Es ist natürlich immer nötig, Eiweißröhren von derselben Verdaulichkeit, sowie auch die gleiche Verdauungszeit und Acidität (0,030 n-HCl, entsprechend der Günzburgzahl 30) zu verwenden.

Was die Pepsinpräparate anlangt, so finden sich auch in diesen hemmende Stoffe, wenn auch in nicht bedeutender Menge. Vergleicht man z. B. wie in der Tabelle V zwei Serien von Verdünnungen von 1 % Parke-Davis' Pepsin in $^n/_{10}$ HCl, die eine mit $^n/_{10}$ HCl, die andere mit inaktivierter 1 %iger Pepsinlösung verdünnt, dann zeigt es sich, daß die mit reiner Salzsäure verdünnten Lösungen eine etwas stärkere Verdauung als die entsprechenden mit der inaktivierten Lösung verdünnten aufweisen. Die letzte Serie enthält, wie leicht ersichtlich ist, in allen Verdünnungen dieselbe prozentische Menge hemmender

Tabelle V.

	Verdünnung mit inaktiviertem Pepsin mm	Verdünnung mit $^n/_{10}$ HCl mm
Verdünnung 1 . .	18,5	18,5
„ 1/2 .	13,9	15,1
„ 1/4 .	9,7	11,7
„ 1/8 .	7,5	8,9

Stoffe und stimmt daher mit der erwähnten Formel $y^{2,45} = kx$ ebensogut überein, wie Serien, die ganz frei von hemmenden Stoffen sind, während die mit Salzsäure verdünnte Serie hemmende Stoffe in verschiedener Menge enthält, weshalb ihre Kurve durch keine Formel ausgedrückt werden kann. Erst in 0,3 %iger Lösung enthält Parke-Davis' Pepsin praktisch genommen keine hemmenden Stoffe, indem zwei entsprechende Serien, von diesem Punkte ausgehend, ganz dieselben Zahlen zeigen.

Die Bedeutung der Hemmung in käuflichem Pepsin kann man noch deutlicher demonstrieren, wenn man Kurven für noch größere Konzentrationen konstruiert. Fig. 1 zeigt ver-

gleichende Pepsinkurven für Armours Pepsin, Langebeks Pepsin und das Pepsin Pharmac. danic. (Die Kurve für Parke-Davis' Pepsin verläuft mit der des Armours Pepsin ganz parallel, nur ein wenig höher.) Die Abszisse gibt die Pepsinmenge in Prozenten, die Ordinate die Anzahl der in 24 Stunden bei 37° verdauten Millimeter an. Die freie Salzsäuremenge ist mit Günzburgs Reaktion bestimmt und in allen Versuchen genau dieselbe. (Es genügt natürlich nicht, die Pepsinpräparate in derselben Menge Salzsäure zu lösen, da die Salzsäurebindung der verschiedenen Präparate höchst verschieden ist.)

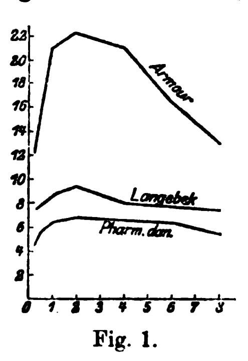


Fig. 1.

Die Kurven in Fig. 1 zeigen für alle drei Pepsinpräparate ein scheinbares Optimum, das etwa bei 2 % gelegen ist. Dieses Optimum repräsentiert also die stärkste Verdauung, die mit dem betreffenden Präparat bei der gegebenen Temperatur überhaupt möglich ist; bei stärkeren Konzentrationen nimmt die Hemmung überhand, so daß 8 % Pepsin weniger als ½prozentiges verdaut. Die gegenseitige Stärke der Pepsine ist dieselbe, wie sie von Johannesen[1]) mit Hilfe der Liebmannschen Methode[2]) vor kurzem gefunden wurde.

Wie man eigentlich die Wirkung der hemmenden Stoffe aufzufassen hat, ist eine Frage, die noch nicht aufgeklärt ist; es ist aber in der letzten Zeit namentlich durch P. Liebmanns Untersuchungen etwas mehr Klarheit in die Sache gebracht worden. Liebmann hat gefunden, daß die Vermehrung der Konzentration hemmender Stoffe nach einer Quotientreihe mit einer entsprechenden Verkleinerung der proteolytischen Kraft nach einer Differenzreihe verbunden ist, und er hat durch Untersuchung verschiedener hemmender Stoffe dieses Gesetz verifiziert. Es hat sich in diesen Untersuchungen gezeigt, daß

[1]) L. Johannesen, Farmac. Tidende **1910**, Nr. 35 u. 36.

[2]) Diese Methode besteht in einer Bestimmung der Transparenz, indem eine Eiweißemulsion durch Zusatz von Pepsin sehr schnell verdaut und dadurch klarer wird.

die Hemmung bei verschiedenen Methoden demselben Gesetz gehorcht, daß aber die absolute Größe derselben bei verschiedenen Methoden verschieden ist; so ist die Hemmung z. B. bei Liebmanns Methode ungefähr 5 mal so groß wie bei Metts Methode (weshalb zum praktischen Gebrauch die letztere vorzuziehen ist). Die Hemmung ist daher wahrscheinlich eher eine Wirkung auf das Substrat als auf das Pepsin, und da es sich bei den beiden erwähnten Methoden um Verdauung von Hühnereiweiß handelt, so muß man annehmen, daß hier namentlich die Oberfläche des Substrats und nicht die Art desselben die wesentlichste Rolle spielt. Dieser Gesichtspunkt ist von großem Interesse und fordert sehr zu fortgesetzten vergleichenden Untersuchungen über die Pepsinwirkung auf verschiedene Substrate auf.

Die optimale Acidität für die Pepsinwirkung.

Es ist namentlich aus S. P. L. Sörensens[1]) Untersuchungen bekannt, daß die Pepsinwirkung von der anwesenden Menge freier Wasserstoffionen in hohem Grade abhängig ist. Durch Titrierung mit dem Günzburgschen Reagens als Indicator kann man, wie ich in einer früheren Arbeit ausführlich bewiesen habe, die Menge freier Salzsäure genau messen, und da diese beinahe vollständig dissoziiert und im Mageninhalt die bei weitem wichtigste Quelle der freien Wasserstoffionen darstellt, so kann man im vorliegenden Falle ebensogut die Konzentration freier Salzsäure wie die Konzentration freier Wasserstoffionen als Maß benutzen. In den folgenden Versuchen sind daher, wie auch in den früheren, die Titrierungszahlen mit Günzburgs Reagens als Ausdruck der freien Salzsäure benutzt worden. Die dazu entsprechenden Wasserstoffionenkonzentrationen sind nicht viel davon verschieden und können mittels der Dissoziationsgrade der Salzsäure (Kohlrauschs Zahlen) berechnet werden.

Das Aciditätsoptimum für die Pepsinwirkung ist häufig untersucht worden; jedoch waren die Methoden zur Aciditätsbestimmung in der Regel ungenau. Nur S. P. L. Sörensen hat die Frage mittels der elektrometrischen Methode unter-

---

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

sucht und gefunden, daß das Optimum für Langebeks Pepsin bei einer Wasserstoffionenkonzentration von etwa 0,020 bis etwa 0,060 gelegen ist. Viel bequemer und in diesen Fällen ebenso genau ist es indessen, mittels erwähnter Titrierung mit Günzburgs Reagens als Indicator die Menge freier Salzsäure zu bestimmen und daraus die Wasserstoffionenkonzentration zu entnehmen.

Die folgenden Tabellen enthalten die Zusammenstellung von Untersuchungen an Pepsin 1. von Menschen, 2. von einem Hunde, 3. von käuflichen Präparaten, nämlich Langebeks, Armours und Parke-Davis' Pepsin. Diese letzteren rühren wahrscheinlich vom Schweine her. In jeder einzelnen Versuchsreihe ist dieselbe Pepsinkonzentration (Mageninhalt gewöhnlich in der Verdünnung 1/10) benutzt worden, während die Konzentration freier Salzsäure von 0 bis 100 variiert wurde. Die Menge freier Salzsäure ist in jedem Versuch durch Titrierung mit Günzburgs Reagens als Indicator bestimmt worden; auch nach der Verdauung wurde die Menge freier Salzsäure bestimmt, welche gewöhnlich um nur höchstens 2 bis 3 (Titrierungszahlen) abgenommen hatte. Um die Darstellung übersichtlicher zu gestalten, sind diese Zahlen in den Tabellen nicht genau angegeben, aber die Versuche sind so geordnet, daß alle Aciditäten zwischen 0 und 10 (Günzburgzahlen) in dieselbe Kolonne kommen, ebenso die zwischen 10 und 20 usw

In der letzten Kolonne findet sich die im Optimalpunkte (d. h. in jener Lösung, die die größte Anzahl Millimeter verdaut hat) vorhandene Menge freier Salzsäure.

Die Tabelle zeigt, daß das menschliche Pepsin ein bedeutend niedrigeres Optimum als die untersuchten tierischen Pepsine hat.

Man dürfte vielleicht eher von einer Optimalzone als von einem eigentlichen Optimalpunkt sprechen, da die Bestimmungen in der Nähe derselben oft ziemlich nahe aneinander liegen, so daß ihre Variationen innerhalb der Fehlergrenze gelegen sind; diese Optimalzone ist aber für Tiere und Menschen höchst verschieden. Für die Menschen liegt sie (mit einer Ausnahme: Nr. 6) zwischen 20 und 33 und für die Tiere zwischen 50 und 75.

Tabelle VI.
Optimum für menschliches Pepsin.

Nr.	Name	Versuchszeit	Freie Salzsäure 0–10	10–20	20–30	30–40	40–50	50–60	60–70	70–80	80–90	90–100	Freie HCl bei Optimum
1	L. L.	24 Std.	3,5	11,3	13,9	15,2	13,7	13,5	13,4	12,4	11,7	11,1	33
2	C. N.	—	—	10,8	13,6	15,4	14,7	13,0	13,0	—	—	—	33
3	D. L.	—	2,6	9,5	13,8	12,5	12,6	12,0	12,6	—	—	10,0	20
4	A. P.	—	3,4	10,3	13,4	12,2	12,6	11,5	11,4	9,8	9,5	8,7	21
5	J. R.	—	3,1	10,0	13,6	13,9	12,8	12,1	—	10,8	—	9,5	32
6	P. H.	—	5,9	7,3	7,8	7,5	7,9	—	6,5	—	6,5	—	47
7	M. P.	—	2,1	6,2	7,3	6,4	6,8	6,0	—	5,2	—	4,9	23
8	A. J.	—	8,1	11,2	11,3	10,8	10,8	—	9,0	—	8,2	—	25
9	A. B.	—	2,3	8,1	10,0	8,8	9,5	8,9	8,4	8,4	7,3	7,1	24
10	B. G.	—	7,7	9,2	9,8	9,4	8,8	8,1	8,0	7,0	6,9	—	29
11	B. E.	6 Std.	0,4	2,0	2,1	2,1	1,9	1,7	1,9	1,9	1,4	—	—
	—	12 „	0,7	4,1	4,3	4,0	4,4	4,2	3,8	3,5	3,5	—	—
	—	24 „	1,7	7,9	8,7	8,5	8,2	8,1	8,1	7,2	7,1	—	20
	—	48 „	2,7	15,0	16,7	16,2	16,0	14,5	14,9	12,6	11,7	—	—
12	R. T.	12 „	2,2	5,3	5,7	5,8	5,3	5,2	4,8	4,6	4,4	3,9	—
		24 „	4,0	10,5	12,2	12,1	12,0	10,9	10,3	10,0	9,0	8,4	25

Tabelle VII.
Optimum für tierisches Pepsin.

Nr.	Pepsin	%	Versuchszeit	Freie Salzsäure 0–10	10–20	20–30	30–40	40–50	50–60	60–70	70–80	80–90	90–100	Freie HCl bei Optimum
1	Langebeck	0,3	24 Std.	1,4	3,1	4,4	5,5	7,2	6,5	6,5	7,3	6,7	6,7	73
2	„	0,6	24 „	2,5	4,0	4,9	6,2	7,4	6,8	7,2	7,1	7,3	—	47
3	„	0,3	24 „	1,4	2,9	4,4	5,0	6,0	5,9	7,2	7,3	6,2	6,6	75
	„	—	48 „	2,3	4,6	8,3	9,7	12,0	13,0	12,1	12,9	12,0	12,0	—
4	Armour	0,03	24 „	—	3,2	5,0	—	5,9	6,7	5,8	6,0	—	—	57
5	„	0,05	—	1,5	3,9	5,6	6,6	7,2	7,9	6,6	7,2	7,0	—	58
6	„	0,1	—	—	—	—	11,4	—	13,5	11,8	11,6	10,9	—	57
7	„	0,2	—	—	7,1	10,7	11,9	13,9	14,5	12,9	12,5	13,1	12,3	53
8	„	0,3	—	4,1	8,8	13,0	15,0	15,4	15,9	15,4	15,0	13,7	13,5	52
9	„	0,25	6 Std.	—	1,7	2,7	3,5	3,7	4,0	3,7	3,7	3,6	—	—
	„	—	12 „	—	3,4	5,4	6,1	7,7	8,0	7,7	7,4	—	—	—
	„	—	24 „	—	6,3	10,3	12,0	14,8	15,8	15,3	13,9	14,2	—	56
10	Parke, Davis	0,1	12 „	0,5	2,2	3,3	3,9	4,2	4,3	4,5	4,1	4,3	4,2	—
	„	—	24 „	1,5	4,5	6,6	7,6	8,4	8,8	9,1	8,0	8,2	7,8	6[illegible]
11	„	0,2	—	0,5	3,0	5,5	8,8	8,8	9,4	9,7	10,4	10,3	9,3	73
12	„	0,3	—	2,6	6,4	10,6	11,5	12,8	15,5	16,0	15,4	14,7	—	65
13	Hundemagensaft	10,0	—	—	6,7	7,7	8,3	8,5	9,0	8,9	7,5	7,7	8,0	53

Auch die tierischen Pepsine differieren voneinander: für Armours Pepsin liegt das Optimum zwischen 50 und 60, für Hundemagensaft ebenso; für Parke-Davis' Pepsin liegt das

Optimum zwischen 65 und 75, und für Langebeks Pepsin wahrscheinlich an derselben Stelle, ist aber hier nicht so deutlich ausgesprochen, weil Langebeks Pepsin im Gegensatz zu den anderen Pepsinen bei den hier verwendeten Konzentrationen stark gehemmt war.

Die verwendete Versuchstemperatur ist 37° gewesen, Versuch 12 ausgenommen, bei dem sie 39° war und während des Versuchs etwas schwankte.

Hinsichtlich der Versuchszeit ist die Optimalzone im wesentlichen dieselbe bei 6, 12, 24 und 48 Stunden. Insoweit sich eine Verschiebung des Optimums mit der Zeit erkennen läßt, erfolgt sie immer in der Richtung, daß das Optimum bei längerer Versuchszeit bei einer geringeren Säurekonzentration liegt (Tabelle V, Versuche 11 und 12), was man schon im voraus als eine Folge der schwächenden Wirkung der Salzsäure auf das Pepsin erwarten mußte.

Daß die Enzyme der verschiedenen Tierarten voneinander abweichen können, ist nichts Neues; Bang hat ähnliche Verhältnisse für das Labferment nachgewiesen und Hammarsten hat gefunden, daß das Pepsin des Hechtes durch Wärme schneller als das Pepsin der Warmblüter zerstört wird. Auch der hier nachgewiesene Unterschied zwischen Pepsinen verschiedenen Ursprungs läßt sich wahrscheinlich auf ähnliche Weise durch eine verschiedene Widerstandskraft gegen die schädigende Wirkung der Salzsäure erklären. Direkte Versuche hierüber haben aber leider noch keine entscheidenden Resultate ergeben.

Ein besonderes Interesse bekommen solche Versuche, wenn es sich zeigt, daß den gefundenen Verschiedenheiten eine gewisse Zweckmäßigkeit von seiten des Organismus zugrunde liegt, und dies scheint eben hier der Fall zu sein Das Optimum für menschliches Pepsin liegt nämlich nach der Tabelle II bei der Günzburgzahl 28 (0,028 n-HCl), die die Durchschnittszahl der 12 Optimalpunktsbestimmungen ist. Diese Salzsäurekonzentration ist aber eben dieselbe, die bei normalen Menschen eine Stunde nach Ewalds Probefrühstück (wenn man den richtigen Indicator für freie Salzsäure, nämlich Günzburgs Reagens, verwendet) gefunden wird. So fand V. Grospietsch[1]) (Breslau)

[1]) V. Grospietsch, Inaug.-Diss. Breslau 1902.

bei Untersuchung von 100 gesunden Menschen die durchschnittliche Günzburgzahl 21 und Yukawa[1]) (Japan) fand bei 81 gesunden Menschen die durchschnittliche Zahl 32. Diese Zahlen sind in guter Übereinstimmung mit den von uns bei Untersuchung von magengesunden Patienten des Reichshospitals in Kopenhagen gefundenen Zahlen.

Der Organismus scheint also danach zu streben, daß der Mageninhalt eben diejenige Acidität erreicht, die für die Wirkung des Pepsins die günstigste ist.

Der Unterschied der Optima ist schwerlich die einzige Verschiedenheit der Pepsine. Wie früher erwähnt, zeigt sich schon in der Art, wie das Eiweiß bei Metts Methode angegriffen wird, ein bemerkenswerter Unterschied, indem das menschliche Pepsin eine verwaschene Grenze bildet, während dieselbe bei Armours oder Parke-Davis' Pepsin sehr scharf bleibt.

Endlich sollen einige Versuche hier kurz erwähnt werden, die gleichfalls auf verschiedene Eigenschaften verschiedener Pepsine deuten. Es handelt sich um vergleichende Versuche mit Liebmanns und Metts Methoden, wobei es sich zeigte, daß Lösungen von Armours Pepsin und von menschlichem Magensaft, die bei Liebmanns Methode dieselbe Verdauung aufwiesen, bei Metts Methode eine höchst verschiedene Verdauung zeigten. Ein menschlicher Magensaft z. B., der bei Liebmanns Methode ebensoviel wie eine 0,05%ige Lösung von Armours Pepsin verdaute, verdaute bei Metts Methode ungefähr soviel, wie eine 10fach stärkere (also ca. 0,05%) Lösung von Armours Pepsin. Wie schon früher erwähnt, ist die Hemmung bei Liebmanns Methode ungefähr 5 mal so groß wie bei Metts Methode; dieser Umstand spielt aber, wie besondere Versuche gezeigt haben, für das eben erwähnte rätselhafte Verhältnis keine Rolle.

Diese Versuche sind noch nicht abgeschlossen; sie werden nur deshalb hier angedeutet, weil auch für sie die wahrscheinliche Erklärung in einer Spezifität der verschiedenen Pepsine zu suchen ist.

---

[1]) Yukawa, Arch. f. Verdauungskrankheiten 13, 523, 1907.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind die folgenden:

1. Die Mettsche Methode gibt, wenn man weich gekochte standardierte Röhren benutzt, vorzügliche Resultate.

2. Die Verdauung bei Metts Methode erfolgt bei niedrigen Aciditäten nahezu proportional mit der Zeit.

3. Salzsäure wirkt bei längerer Einwirkung tötend auf das Pepsin, wie es schon von P. Liebmann und L. Johannesen durch Liebmanns Methode nachgewiesen wurde.

4. Die Proportionalität der Verdauung mit der Zeit, die bei niedrigen Aciditäten ziemlich genau erfolgt, ist bei höheren Aciditäten nicht deutlich zu erkennen, weil die obenerwähnte schwächende Wirkung der Salzsäure auf das Pepsin sich geltend macht.

5. Das Schützsche Gesetz ($y^2 = kx$, wo y die verdaute Rohrlänge, x die Pepsinmenge bedeutet), gilt nicht ganz genau für Metts Methode, weil 1. die Diffusionsverhältnisse, 2. die schädigende Wirkung der Salzsäure auf das Pepsin störend einwirken. Bei den Aciditäten $^n/_{20}$- bis $^n/_{10}$-HCl hat die empirische Formel $y^{2,45} = kx$ Geltung; diese Modifikation des Schützschen Gesetzes rührt aber wahrscheinlich nur von den erwähnten äußeren Umständen her.

6. Die optimale Acidität für die Pepsinwirkung liegt für menschliches Pepsin bedeutend niedriger als für tierisches Pepsin.

7. Der menschliche Organismus scheint danach zu streben, daß der Mageninhalt eben diejenige Acidität erreicht, die für die Wirkung des Pepsins die günstigste ist.

Für die Anregung zu dieser Arbeit muß ich meinem Chef, Prof. Knud Faber, meinen besten Dank aussprechen.

Beiträge zur Frage der Glykolyse.

Von

Walther Löb.

III. Mitteilung.

Über den Einfluß der Glykokoll- und Borsäureanionen auf die oxydative Phosphatglykolyse.

Von

Walther Löb und S. Gutmann.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses, Berlin.)

(Eingegangen am 19. September 1912.)

In der zweiten Mitteilung[1]) über das in der Überschrift genannte Problem ist gezeigt worden, daß die Phosphatanionen die ganz spezifische Fähigkeit besitzen, die Traubenzuckeroxydation durch Wasserstoffsuperoxyd bei Blutalkalescenz zu beschleunigen, eine Erscheinung, die als katalytische Beeinflussung der Hydroxylionenwirkung auf die der Oxydation vorausgehenden Spaltungsvorgänge des Zuckers aufgefaßt wurde. Ob eine intermediäre Bildung von Phosphorsäureester oder ein anderer Vorgang als Ursache der Phosphatwirkung anzusehen ist, blieb unerörtert; diese Frage soll auch nicht in dieser, sondern erst in einer späteren Mitteilung behandelt werden.

Wichtiger erschien es zunächst, eine andere Beobachtung genauer zu verfolgen, und zwar die der Hemmung der Phosphatglykolyse durch eine große Anzahl von Substanzen, die, in geringer Menge zugegen, die Oxydation weniger oder mehr, bis zum vollständigen Stillstand aufzuhalten vermögen, ohne daß das oxydierende Agens, das Wasserstoffsuperoxyd, verbraucht wird. Diese, von dem einen von uns[2]) schon genauer untersuchte Schutzwirkung für den Zucker gegen die oxydative Phos-

[1]) Diese Zeitschr. **32**, 43, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. **32**, 52, 1911.

phatglykolyse kommt neben anderen Substanzen den ersten Abbauprodukten des Eiweißes, den Albumosen und Peptonen, in hervorragendem Maße zu. Nachdem nun durch die mit Beysel[1]) ausgeführten Untersuchungen festgestellt war, daß für den Eintritt der Oxydation die Wasserstoff- und Hydroxylionenkonzentration allein nicht entscheidend ist, sondern daß bei gleicher Ionenkonzentration, die mit Hilfe der Sörensen-Michaelisschen Reaktionsregulatoren hergestellt werden kann, nur die Phosphatmischungen wirksam sind, während z. B. Glykokoll- und Borsäuremischungen vollständig versagen, blieb zu entscheiden, wie diese unwirksamen Salzmischungen, den Phosphatmischungen zugesetzt, auf die Phosphatglykolyse einwirken. Die Beantwortung dieser Frage ist nach mehreren Richtungen von Interesse. So kann man die Mischung der verschiedenen Salze leicht so herstellen, daß bei ihrer gleichzeitigen Verwendung überhaupt keine Verschiebung der Wasserstoff- und Hydroxylionenkonzentration eintritt, so daß, die katalytische Beeinflussung der letzteren durch Phosphationen vorausgesetzt, eine Hemmung oder sonstige Veränderung dieser Katalyse durch die anderen Anionen besonders deutlich in Erscheinung treten muß.

Ein anderer Gesichtspunkt betrifft die Beziehungen dieser Versuche zur Hyperglykämie und ihre Folge- bzw. Begleiterscheinungen. Die sich hier ergehenden Anschauungen werden in einer besonderen Mitteilung entwickelt werden.

Die Wahl des Glykokolls und der Borsäure wurde durch den Umstand veranlaßt, daß in dem ersteren die einfachste Aminosäure, also ein elementarer Bestandteil des Eiweißmoleküls, vorliegt, während die Borsäure als ein vollständig artfremder Körper den Vergleich mit der Wirkung der biologisch wirksamen Aminosäure besonders interessant erscheinen läßt.

Experimenteller Teil.

Nach den Angaben von Sörensen[2]) lassen sich leicht Glykokoll-Natronlaugelösungen und Natriumborat-Salzsäurelösungen herstellen, die bezüglich ihrer Wasserstoff- und Hydr-

---

[1]) Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin. Centralbl. f. Physiol. 26, Heft 2, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

oxylionenkonzentration mit einer Phosphatlösung fast genau gleich eingestellt werden können. Für solche Lösungen ist bereits gezeigt worden, daß sie keine Beschleunigung der Zuckeroxydation hervorzurufen vermögen, wie es durch isohydrische Phosphatlösungen geschieht. Die folgenden Versuche zeigen nun, daß aber die Wirkung dieser beiden Stoffe auf die Phosphatglykolyse selbst eine ganz verschiedene ist. Während die Borsäureanionen sie nicht beeinflussen, nicht hemmen und nicht beschleunigen, sind die Glykokollanionen ein typisches Gift für die oxydative Phosphatglykolyse, und zwar ist, wie schon beiläufig festgestellt wurde, die Größe der Giftwirkung von der absoluten Glykokollkonzentration abhängig.

Die für die Versuche verwandten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

1. 0,1 n-Glykokollösungen mit 7,505 g Glykokoll und 5,85 g Kochsalz im Liter. Diese Lösung wurde gemischt mit 0,1 n-Natronlauge in wechselndem Verhältnis. Es wurden zwei Ionenkonzentrationen zur Durchführung der Versuche gewählt, und zwar besaß die Mischung 9,9 ccm Glykokoll + 0,1 ccm Natronlauge den Wasserstoffionenexponenten $p_H = 0{,}788$[1]; die Mischung von 9,75 ccm Glykokoll + 0,25 ccm Natronlauge den Wasserstoffionenexponenten $p_H = 0{,}81$.

2. 0,2 m-Borsäure entsprechend 12,404 g und 100 ccm 1 n-Natronlauge auf ein Liter. Diese Lösung wurde zur Herstellung des Ionenexponenten $p_H = 0{,}788$ in dem Verhältnis 5,5 ccm Borsäurelösung + 4,5 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure gemischt, während zur Herstellung der Ionenkonzentration $p_H = 0{,}81$ 6,0 ccm Borsäurelösung mit 4,0 ccm Salzsäure gemischt wurden.

3. $^m/_{15}$-primäre Natriumphosphat- und $^m/_{15}$-sekundäre Natriumphosphatlösung, hergestellt aus reiner $^m/_1$-Phosphorsäure und Normalnatronlauge. Die Mischung von 9 ccm sekundärer Phosphatlösung mit 1 ccm primärer gab den Ionenexponenten $p_H = 0{,}788$; die Mischung von 9,9 ccm der sekundären Salzlösung mit 0,1 ccm der primären den Exponenten $p_H = 0{,}81$.

[1]) Die angegebenen Werte von p_H dürften nicht ganz genau sein; für die vorliegende Frage sind die möglichen Abweichungen völlig bedeutungslos.

4. Eine 2 %ige sterile Lösung von reinstem Traubenzucker.

5. Eine 3 %ige Lösung von Wasserstoffsuperoxyd, hergestellt aus reinem Perhydrol.

Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen findet sich in den Tabellen, die die Versuchsergebnisse wiedergeben. Die Zuckerbestimmung wurde nach der genauen Methode von Bertrand vor Beginn und nach Beendigung der Versuche ausgeführt. Die Beobachtung der Polarisation diente als Kontrolle, jedoch sind die nach der Bertrandschen Methode gefundenen Daten als die entscheidenden zu betrachten, da die Polarisationsmethode die subjektiven Ablesungsfehler enthält.

Aus den Versuchen geht hervor, daß bei den beiden gewählten Ionenkonzentrationen das Bild der Wirkung der Zusätze genau dasselbe bleibt. Während die Gegenwart der Phosphate die Zuckerverbrennung ungemein beschleunigt, ist die katalytisch unwirksame Borsäure auf die Phosphatglykolyse fast wirkungslos; der Zusatz der Glykokollösungen aber hebt die Phosphatglykolyse nahezu vollständig auf, so daß die Zuckeroxydation durch Wasserstoffsuperoxyd ohne jeden katalytischen Zusatz stärker ist, als die in Gegenwart der Phosphate, wenn zugleich Glykokoll dabei ist. Setzt man sowohl Glykokoll wie Borsäure in den angegebenen Konzentrations- und Mengenverhältnissen der Phosphatmischung bei der Zuckeroxydation zu, so ist die Wirkung des Glykokolls überwiegend, d. h. die Glykolyse wird nahezu vollständig zum Stillstand gebracht. Verdoppelt man die Menge der Borsäure, so wird die Phosphatglykolyse ebenso wenig gehemmt, wie bei Anwendung der geringeren Menge der Borsäure; verdoppelt man aber die Menge des Glykokolls, so ist die Hemmung der Phosphatglykolyse eine stärkere. Ebenso also, wie früher festgestellt werden konnte, daß die absolute Menge der Phosphate für die Größe der Beschleunigung von Bedeutung ist, zeigt sich die Menge des Glykokolls von Einfluß auf die Größe der Hemmung der Phosphatglykolyse. Die absolute Menge der auf die Oxydation wirksamen Substanzen ist sehr gering. So genügt, wie aus den Versuchen hervorgeht, 0,09 g Glykokoll, um in einer Lösung, die 0,5 g Zucker und 0,75 g Wasserstoffsuperoxyd enthält, die Oxydation fast vollständig zum Stillstand zu bringen. Es ist gewiß

nicht ohne Interesse, daß zwei Substanzen, die, wie phosphorsaure Salze und eine einfache Aminosäure mit biologischen Vorgängen in engem Zusammenhange stehen, in so ausgeprägtem, wenn auch antagonistischem Sinne auf den biologisch gleichfalls bedeutungsvollen Vorgang der Zuckeroxydation einwirken, während die den natürlichen Lebensreaktionen fernstehende Borsäure nach keiner Richtung hin diese Aktivität zeigt. Zur Auffindung gesetzmäßiger Beziehungen in der katalytischen Hemmung und Beschleunigung der Zuckeroxydation wird die Untersuchung fortgesetzt.

Die Versuchsergebnisse sind tabellarisch zusammengestellt. Die Versuchsdauer betrug stets 48 Stunden, die Temperatur 37°.

Versuchsergebnisse.

Tabelle I.

$p_H = 0,788$.

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Reaktionslösung	Zuckergehalt vor dem Versuch		Zuckergehalt nach dem Versuch		Glykolyse = oxyd. Zucker in 100 ccm
		Polaris. %	Bertrand %	Polaris. %	Bertrand %	g
1	25 ccm Zuckerlösung 50 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,46	0,45	0,12
2	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,26	0,28	0,29
3	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Borsäurelösung 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,27	0,28	0,29
4	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,52	0,55	0,02
5	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Borsäurelösung 12,5 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,52	0,51	0,06

Tabelle II.

$p_H = 0,788$.

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Reaktionslösung	Zuckergehalt vor dem Versuch		Zuckergehalt nach dem Versuch		Glykolyse in 100 ccm
		Polaris. %	Bertrand %	Polaris. %	Bertrand %	g
1	25 ccm Zuckerlösung 50 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,34	0,35	0,19
2	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,28	0,26	0,28
3	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Borsäurelösung 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,30	0,29	0,25
4	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,51	0,54	0,00
5	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Borsäurelösung 12,5 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,31	0,29	0,25
7	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Glykokollösung 12,5 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,46	0,44	0,10
8	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Borsäurelösung 25 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,52	0,54	0,50	0,49	0,05

Tabelle III.

$p_H = 0,81$.

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Reaktionslösung	Zuckergehalt vor dem Versuch		Zuckergehalt nach dem Versuch		Glykolyse in 100 ccm
		Polaris. %	Bertrand %	Polaris. %	Bertrand %	g
1	25 ccm Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,64	0,65	0,37	0,34	0,31

Tabelle III (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Reaktionslösung	Zuckergehalt vor dem Versuch		Zuckergehalt nach dem Versuch		Glykolyse in 100 ccm
		Polaris. %	Bertrand %	Polaris. %	Bertrand %	g
2	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Borsäurelösung 25 „ H_2O_2	0,64	0,65	0,36	0,34	0,31
3	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,64	0,65	0,62	0,57	0,08
4	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Glykokollösung 12,5 „ Borsäurelösung 25 „ H_2O_2	0,64	0,65	0,55	0,54	0,11
5	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,26	0,26	0,31
6	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Borsäurelösung 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,26	0,28	0,29
7	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,54	0,57	0,49	0,51	0,06

Tabelle IV.

$p_H = 0,81$.

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Reaktionslösung	Zuckergehalt vor dem Versuch		Zuckergehalt nach dem Versuch		Glykolyse in 100 ccm
		Polaris. %	Bertrand %	Polaris. %	Bertrand %	g
1	25 ccm Zuckerlösung 50 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	0,54	0,49	0,09
2	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	0,35	0,32	0,26

Tabelle IV (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Reaktionslösung	Zuckergehalt vor dem Versuch		Zuckergehalt nach dem Versuch		Glykolyse in 100 ccm
		Polaris. %	Bertrand %	Polaris. %	Bertrand %	g
3	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Borsäurelösung 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	0,36	0,38	0,20
4	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 25 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	0,56	0,58	0,00
5	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Borsäurelösung 12,5 „ Glykokollösung 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	—	0,51	0,07
6	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Borsäurelösung 12 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	0,36	0,38	0,20
7	25 „ Zuckerlösung 25 „ Phosphatgemisch 12,5 „ Glykokollösung 12,5 „ Wasser 25 „ H_2O_2	0,60	0,58	0,48	0,51	0,07

Über das Schicksal der Glyoxylsäure im Tierkörper.

Von

Georg Haas.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Straßburg.)

(Eingegangen am 25. September 1912.)

Die ersten Untersuchungen über das Schicksal der Glyoxylsäure im Tierkörper wurden von Pohl[1]) in Hofmeisters Institut ausgeführt. Er fand in einem Versuch nach Verfütterung von Glyoxylsäure an Hunde eine Steigerung der Oxalsäureausscheidung im Harn. Diese Beobachtung fand ihre Bestätigung in späteren Arbeiten von Eppinger[2]), Dakin[3]) und Adler[4]). Da jedoch die ausgeschiedenen Mengen Oxalsäure, wenn sie auch nicht unbeträchtliche Werte repräsentieren, nicht in entsprechendem Verhältnis stehen zu der zugeführten Menge von Glyoxylsäure, so ist anzunehmen, daß die Glyoxylsäure noch auf andere Weise im Körper verarbeitet wird.

Eine Ausscheidung von unveränderter Glyoxylsäure im Harn wurde von den genannten Forschern nicht beobachtet. Pohl konnte auch keine Vermehrung der Ameisensäure im Harn nachweisen; er sah die Glyoxylsäure als unmittelbare Vorstufe der Kohlensäure an, weil sie in der Reihe der niederen Fettsäuren die sauerstoffreichste und wasserstoffärmste ist, die bei Verfütterung in erheblicher Menge verschwindet, im Gegensatz zu Oxalsäure und Ameisensäure, die, obgleich höher oxydiert, den Organismus zum Teil unverbrannt verlassen. Auch Dakin, der Glyoxalat per os und subcutan an Hunde verabreichte, konnte keine Vermehrung von Ameisensäure im Harn finden.

---

1) Pohl, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **37**, 417.

2) Eppinger, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**.

3) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. **3**, Nr. 1, 1907.

4) Adler, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **56**, 202.

Der Auffassung Pohls lag die früher allgemein gehegte Vorstellung zugrunde, daß der Abbau der Fettkörper im Organismus in ähnlicher Weise stufenförmig erfolgt wie bei der Oxydation in vitro, eine Vorstellung, die in dieser schematischen Form nicht mehr festgehalten werden kann, seit nachgewiesen ist, daß die oxydativen Abbauvorgänge sich mit Synthesen, Spaltungen und Umlagerungen in nicht vorauszusehender Weise kombinieren können.

In der Tat hat später Eppinger im hiesigen Laboratorium beobachtet und Adler bestätigt, daß es bei Verfütterung von Glyoxylsäure zu einer Allantoinvermehrung im Harn, also anscheinend zu einer Synthese mit Harnstoff kommt. Allerdings handelte es sich nicht um sehr hohe Werte, und Dakin konnte den Befund einer Allantoinvermehrung im Harn nach Verabreichung von Glyoxylsäure überhaupt nicht bestätigen. Darnach dürfte nur ein geringer Teil der eingeführten Glyoxylsäure dieser Umwandlung unterliegen.

Eine weitere Möglichkeit der Veränderung der Glyoxylsäure ergibt sich aus dem von Parnas[1]) im hiesigen Institut geführten Nachweis, daß Aldehyde im Tierkörper unter dem Einfluß einer „Mutase" der Cannizaroschen Reaktion unterliegen. Bei der Leichtigkeit, mit der Glyoxylsäure in alkalischer Lösung in Glykolsäure einerseits, Oxalsäure andererseits übergeht, war auch hier die gleiche Umlagerung zu erwarten, und man dürfte wohl das beobachtete Auftreten der Oxalsäure geradezu als einen Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung ansehen, wenn es gelänge, das gleichzeitige Entstehen von Glykolsäure nachzuweisen.

Die Erfahrungen der jüngsten Zeit, die die Bildung von Amino- aus Ketonsäuren erwiesen haben, legen endlich die Vermutung nahe, daß die Glyoxylsäure unter Stickstoffaufnahme in Glykokoll übergehen könnte[2]).

Da sowohl Glykolsäure als Glykokoll im intakten Tier rasch weiter abgebaut werden, war eine Aufklärung über diese Fragen kaum von Fütterungsversuchen zu erwarten. Eher ver-

[1]) Parnas, diese Zeitschr. 28, 1910.

[2]) Knoop, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 480. — Embden und Schmitz, diese Zeitschr. 29, 423; 38, 393. — Kura Kondo, diese Zeitschr. 38, 407. — Hanni Fellner, diese Zeitschr. 38, 414.

sprachen hier Versuche mit Organbrei und Organdurchblutung Erfolg, zumal frühere im hiesigen Laboratorium ausgeführte Versuche nach dieser Richtung hinwiesen.

Schloß[1]) hatte nämlich Glyoxylsäure mit dem Brei einzelner Organe zusammengebracht und beobachtete dabei ein Verschwinden der Säure. Er fand, daß von den untersuchten Organen (Leber, Milz, Lunge, Niere, Gehirn, Muskel, Blut) der Leber weitaus die größte Fähigkeit zukommt, Glyoxylsäure zum Verschwinden zu bringen. Wurde Glyoxylsäure im Verhältnis 1:1000 zum Leberbrei gegeben, so fiel die „Indolreaktion“, wie sie Eppinger und Schloß zum Nachweis der Glyoxylsäure angegeben hatten, unter den sorgfältigsten Kautelen angewandt, nach 4 Stunden stets negativ aus.

Wie Granstroem[2]) feststellte, hebt Erhitzen des Leberbreies auf 80° diese Wirkung auf, weshalb er sie als fermentativ auffaßte. Analog den Befunden einer vermehrten Oxalsäureausscheidung im Harn war unter den Umwandlungsprodukten vor allem Oxalsäure zu erwarten, jedoch suchte sie Granstroem im Harn vergebens.

Eine endgültige Aufklärung über das Schicksal der Glyoxylsäure in der Leber ist somit nicht gegeben. Durch die nachstehend mitgeteilten Versuche war ich bemüht, das in der Leber entstehende Umwandlungsprodukt der Glyoxylsäure zu fassen.

Der Gang derselben gestaltete sich derart, daß ich

I. Experimente mit Leberbrei,
II. Experimente mit Hilfe des Durchblutungsverfahrens am überlebenden Organ,
III. Verfütterungsversuche

ausführte.

I. Versuche mit Leberbrei.

Es kamen Lebern von Kaninchen, Rind und Schwein in Verwendung.

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei Schloß und Granstroem.

Das Verschwinden der Glyoxylsäure kann ich bestätigen, insofern als in allen Digestionsversuchen mit Leber-

[1]) Schloß, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 445.
[2]) Granstroem, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 214.

brei eine Abnahme in der Intensität der „Indolreaktion" auftrat. Ein totales Verschwinden der Reaktion konnte jedoch niemals konstatiert werden. Diese Verschiedenheit in der Beobachtung mag zum Teil daher rühren, daß ich zwecks Isolierung von Reaktionsprodukten größere Dosen Glyoxylsäure verabreichte (das Verhältnis Glyoxylsäure zu Leber war 1:100) und deshalb die Glyoxylsäure nicht total von der Leber aufgearbeitet wurde, zum andern Teil daher, daß in der Leber während der Digestionszeit noch Substanzen entstehen, die die Indolprobe schwach positiv erscheinen lassen.

Die Farbenreaktion auf Glyoxylsäure wurde in einem Teil der Versuche dahin modifiziert, daß statt Indol eine Messerspitze Witte-Pepton der zu untersuchenden Flüssigkeit zugesetzt und mit derselben gut durchgeschüttelt wurde. Diese Art der Prüfung hat zwar den Nachteil, daß die Farbenreaktion an der Grenzzone Schwefelsäure — wässerige Lösung nicht so prompt auftritt, sie bietet jedoch den großen Vorteil, daß die Farbe ein Blauviolett darstellt, das durch die Braunrotfärbungen, die sich bei nicht ganz vorsichtigem Unterschichten des Leberfiltrates mit konz. Schwefelsäure einstellen, nicht so leicht verdeckt wird wie die Rotfärbung nach Indolzusatz.

Zum Nachweis der Glykolsäure im Filtrat des durch Kochen unter Zusatz von saurem phosphorsaurem Kali enteiweißten Leberdigestionsgemisches wurde auf die Darstellung des Esters[1]) ausgegangen.

Die Oxalsäure sollte in der gewöhnlichen Weise als Calciumsalz zur Abscheidung kommen.

Weder Glykolsäure noch Oxalsäure konnten nachgewiesen werden. Ebensowenig gelang es, Kohlensäurebildung sicherzustellen. Es ergab sich auf seiten des mit Glyoxylsäure versetzten Leberbreies keine Vermehrung gegenüber dem Kontrollversuch[2]).

---

[1]) E. Fischer und Arthur Speier, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 3253.

[2]) Auch Herr Dr. Freise, der im hiesigen Institut Kohlensäurebestimmungen während der Durchblutung der Leber unter Glyoxylsäurezusatz ausführte, konnte keine Vermehrung der CO_2-Bildung beobachten. Herr Dr. Freise wird über seine einschlägigen Versuche demnächst genauer berichten.

Die Untersuchung auf etwa gebildetes Glykokoll wurde im Koagulationsfiltrat nach Ausfällen mit Phosphorwolframsäure mit Hilfe der Naphthalinsulfomethode ausgeführt. Es wurde kein Anhaltspunkt für Glykokollbildung gefunden. Die Reaktionsprodukte mit β-Naphthalinsulfochlorid waren auf seiten der Kontrollebern in derselben Menge vorhanden wie auf seiten der mit Glyoxylsäure versetzten. Ferner sprachen die vergleichenden Stickstoffbestimmungen in den gesammelten Niederschlägen gegen eine nennenswerte Bildung von Glykokoll.

Auch eine Vermehrung der flüchtigen Fettsäuren Ameisensäure und Essigsäure konnte nach Verseifung des mit Alkali versetzten, enteiweißten Leberfiltrates und nach Ansäuern mit Phosphorsäure und durchgeführter Wasserdampfdestillation nicht sichergestellt werden.

Als später bei den Versuchen mit Blutdurchleitung eine merkliche Bildung von Ameisensäure nachgewiesen worden war (s. unten), habe ich den Versuch unter dauernder Luftdurchleitung wiederholt. Darnach mit positivem Erfolg.

Versuch mit Leberbrei (Kaninchen) bei 37° und 2stündiger Dauer unter Durchleiten von Luft:

Die Leber, 50 g schwer, der 0,8 g Glyoxylsäure zugesetzt wurden, produzierte 0,02283 g Ameisensäure. (Die Kalomelmenge wurde durch Chlortitration bestimmt; s. u.) Die Kontrollleber, 71 g schwer, ergibt nur Spuren von Kalomel. In der Leber mit Zusatz von Glyoxylsäure ist nach 2 Stunden die Indolprobe noch stark positiv, ein Beweis, daß noch nicht alle Glyoxylsäure verarbeitet ist.

II. Durchblutung der überlebenden Leber unter Zusatz von Ammoniumglyoxalat.

Es wurden stets Kaninchenlebern benutzt. 100 ccm Glyoxylsäurelösung[1]) (4 ccm dickflüssige Säure als NH_4-Salz auf 100 ccm verdünnt) wurden sehr langsam im Laufe von 20 Minuten dem Blute — es kam der Mandelsche Durchblutungsapparat zur Verwendung — zugesetzt, da die Glyoxylsäure in zu hoher Konzentration ev. auf das Gefäßsystem nicht ohne

[1]) Von der Reinheit des Präparates (bezogen von Dr. Grübler & Schuchardt) überzeugte ich mich durch Titration abgewogener Mengen.

Einfluß ist[1]). Die Durchblutungsversuche wurden nach 2 Stunden abgebrochen. Die Untersuchung war hauptsächlich auf den Nachweis von flüchtigen Fettsäuren, insbesondere Ameisensäure, und von Glykokoll bzw. von stickstoffhaltigen, nicht basischen Derivaten außer Harnstoff gerichtet.

Um die Eiweißkörper zu fällen, wurde die gesamte Blutmenge und die zerkleinerte Leber in einen Emailtopf gebracht, der die dreifache Menge kochendes Wasser enthielt, dem Zinksulfat und $1^1/_2$ ccm konz. Schwefelsäure zugesetzt war, die gesamte Flüssigkeit unter Umrühren nochmals erhitzt, bis sie eben zu kochen begann, erkalten gelassen und das Gesamtvolumen bestimmt. Abgemessene Mengen des Filtrates wurden in saurer Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt und zur Stickstoffbestimmung und zur Destillation verwandt.

Ferner wurden abgemessene Flüssigkeitsmengen (1 l) mit 15 g krystallisierter Phosphorsäure versetzt und mit Wasserdampf so lange destilliert, bis im Destillat die saure Reaktion vollkommen verschwunden war, was oft tagelanges Destillieren erforderte. Nach Neutralisation des Destillates mit reinster Natronlauge und Einengen auf dem Wasserbad wurde dasselbe mit der gleichen Menge kalt gesättigter Sublimatlösung versetzt, mit Essigsäure leicht angesäuert und 6 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Das gebildete Kalomel wurde bis zum nächsten Morgen absitzen gelassen, durch ein Platin-Goochfilter abgesaugt, chlorfrei gewaschen und sodann gewichtsanalytisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde in einem Versuch (3) die Menge Kalomel nicht durch Wägung, sondern durch Bestimmung des Chlors (s. u.) ermittelt.

In beifolgender Tabelle gebe ich die Differenzen in den Ameisensäurewerten wieder, die sich zwischen dem Durchblutungsblut mit Zusatz von Glyoxylsäure und dem Kontrollblut herausstellten.

Die Ameisensäurezahlen, aus denen ich die Differenzen berechnete, beziehen sich auf die Gesamtmenge Blut, die durch den Apparat ging, + Leber + 100 ccm Glyoxylsäurelösung

[1]) Vgl. die toxikologischen Störungen, die Adler beobachtete; auch Parnas und Baer (diese Zeitschr. 41, 416) sahen systolischen Herzstillstand an der Schildkröte nach Infusion von glyoxylsaurem Salz.

Es wird dabei die Voraussetzung gemacht, daß in der Leber zum Schluß die Ameisensäure in derselben Konzentration vorhanden war wie in dem entsprechenden Gewicht Blut.

Tabelle.

Versuchs-Nr.	Gewicht der Leber g	Vermehrung der HCOOH-Bildung im Blute mit Zusatz gegenüber dem Blute ohne Zusatz von CHOCOOH mg
1	95	62,7
2	96	53,4
3	95	33,5

Als Kontrollblut diente in Versuch 1 Blut, das ohne Zusatz von Glyoxylsäure die Leber im Durchblutungsapparat 2 Stunden durchströmte.

In Versuch 2 und 3 wurden als Kontrollblut dem Durchblutungsblut vor Zusatz von Glyoxylsäure abgemessene Mengen entnommen, darin die Ameisensäuremengen bestimmt und entsprechend umgerechnet auf die Gesamtblutmenge + Leber, die beim Durchblutungsversuch mit Zusatz von Glyoxylsäure zur Verwendung kam.

Das dreifach verdünnte Blutfiltrat zeigte stets positive Indolreaktion.

Was die Glykokollbildung aus glyoxylsaurem Ammoniak in der Leber anbetrifft, so sprachen die erhaltenen Zahlen gegen eine nennenswerte Bildung von Glykokoll aus glyoxylsaurem Ammoniak, wenn sie auch nicht mit absoluter Sicherheit eine Glykokollbildung in geringem Grade ausschließen[1]). Es wurde bei Verwendung von Ammoniak eine entsprechende Zunahme der Gesamtstickstoffwerte im Durchblutungsblute ermittelt, die zum allergrößten Teil auf einer Vermehrung des Harnstoff-

[1]) Die Versuche waren vor Erscheinen der Arbeit von Embden und Schmitz „Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber" II, diese Zeitschr. 38, 393, in Angriff genommen. In dieser Arbeit teilen E. und S. mit, daß es ihnen nach Durchblutung der Leber mit Ammoniumglyoxalat gelungen sei, mit der Naphthalinsulfochloridmethode eine zur sichereren Identifizierung nicht hinreichende Menge einer Substanz zu isolieren, die Naphthalinsulfoglykokoll sein konnte. Sie messen jedoch diesem Befund keine entscheidende Bedeutung bei, da die gefundene geringe Menge möglicherweise von dem normalerweise im Blut vorkommenden Glykokoll herstammen konnte.

stickstoffs beruhte und als Folge der Überführung des Ammoniaks in Harnstoff anzusehen ist. Daß der Glyoxylsäurekomponente bei der vermehrten Bildung von Harnstoff keine Rolle zukommt, zeigte ein Durchblutungsversuch, bei dem Glyoxylsäure als Natriumsalz zugesetzt wurde. In demselben überschritten die Harnstoffstickstoffzahlen nicht den Normalwert, der im Blute ohne Zusatz gefunden wurde.

Eine Vermehrung des nicht durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffanteils, in dem eine Neubildung von Glykokoll oder anderen Aminosäuren hätte zum Ausdruck kommen müssen, war nicht festzustellen.

III. Fütterungsversuche.

Wenn die Leber die Fähigkeit besitzt, aus Glyoxylsäure Ameisensäure zu bilden, so ist bei der von Pohl nachgewiesenen relativen Schwerverbrennlichkeit der Ameisensäure zu erwarten, daß bei Verfütterung von erheblicheren Mengen Glyoxylsäure Formiat im Harn zur Ausscheidung kommt.

Diese Vermutung erwies sich bei Versuchen am Hunde als richtig.

Bei der Verarbeitung des Hundeharnes erwies sich die Scalasche Methode der quantitativen Ameisensäurebestimmung, wie sie von Pohl[1]) für den Harn angegeben ist, insofern unzuverlässig, als bei der Destillation, die sehr lange fortgesetzt werden mußte, merkliche Mengen Schwefel ins Destillat übergingen und durch Bildung von Quecksilbersulfid, das sich dem Kalomel beimengte, die Gewichtsbestimmungen ungenau machten. Es wurden deshalb die Kalomelmengen durch Chlortitration bestimmt. Ich ging so vor, daß ich den in einem Platin-Gooch-Tiegel chlorfrei gewaschenen Niederschlag quantitativ in ein Becherglas überspülte, eine halbe Stunde mit chlorfreiem Alkali kochte und die Flüssigkeit auf ein Gesamtvolumen von 250 ccm brachte. Davon wurde ein aliquoter Teil bei jeder Bestimmung zur Volhardschen Chlortitration benutzt. Die Brauchbarkeit dieses Vorgehens wurde zuerst im reinsten Kalomel ausprobiert. Es wurden von 0,3323 g Kalomel gefunden 0,3324 g, somit 100,03%.

---

[1]) Pohl, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 31.

Fütterungsversuch.

Kleiner bis mittelgroßer Hund, 16 kg schwer.

Datum	Menge Harn ccm	Menge HCOOH g	
16. VII. 12 früh 8^h bis 17. VII. 12 früh 8^h	570	0,00652	17. VII. 12 abends 4,2725 g CHOCOOH als Ca-Salz per Schlundsonde.
17. VII. 12 8^h bis 18. VII. 12 8^h	570	0,00652	
18. VII. 12 8^h bis 19. VII. 12 8^h	876	0,02351	
19. VII. 12. 8^h bis 20. VII. 12 8^h	505	0,05412	

Ich habe noch zwei Fütterungsversuche angestellt, die in demselben Sinne verliefen, wie schon makroskopisch an den gebildeten Mengen Niederschlag zu sehen war, doch sehe ich davon ab, die für Kalomel erhaltenen Zahlen wiederzugeben, da dieselben durch Gewichtsanalyse gewonnen und vermutlich etwas zu hoch sind. Das Versuchstier vertrug die beigebrachten Mengen Glyoxylsäure gut, ich konnte keinerlei Krankeitssymptome an ihm erkennen.

Wir sehen also auch hier, daß nach Einfuhr von Glyoxylsäure eine nicht unbeträchtliche Menge Ameisensäure gebildet wird. Daß dieselbe erst relativ spät zur Ausscheidung kommt, mag zum Teil an der Schwerlöslichkeit des Calciumsalzes der Glyoxylsäure gelegen sein, das zur Umsetzung im Darm Zeit bedarf, ferner scheint die Ameisensäure, wie das auch aus den Ameisensäurebestimmungen von Pohl[1]) nach Verabreichung von Methylalkohol hervorgeht, nur langsam zur Ausscheidung zu kommen.

Daß die ausgeschiedene Ameisensäure im Hundeorganismus auf Kosten der Glyoxylsäure entstanden ist, kann im Hinblick auf die Versuche mit Leberbrei und Leberdurchblutung kaum bezweifelt werden. Doch möchte ich nicht unerwähnt lassen, daß Dakin[2]) in einer seiner letzten Arbeiten von einer vermehrten Ameisensäurebildung nach Verabreichung von einfachen

[1]) Pohl, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **31**.

[2]) H. D. Dakin and A. J. Wakeman, Journ. of Biol. Chem. Mai 1911, **9**, 327.

Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Cupronsäure) berichtet. Vielleicht ist dieser Befund so zu deuten, daß der Abbau dieser Säuren zu Ameisensäure über Glyoxylsäure geht.

IV. Schlußbemerkungen.

Das Schicksal der Glyoxylsäure im Tierkörper dürfte ebenso wie manche andere Erfahrungen der jüngsten Zeit eindringlich lehren, daß es nicht angezeigt ist, die Veränderungen chemischer Stoffe im Tierkörper einseitig nach ihrem sonst bekannten chemischen Verhalten zu beurteilen. Weder die einfache Oxydation zu Oxalsäure oder zu Kohlensäure, noch die Cannizarosche Umlagerung zu Glykol- und Oxalsäure können deren typischen Abbauvorgang darstellen. Vermutlich erfolgt der Abbau je nach Umständen verschieden. Nachstehend gebe ich eine Übersicht der vorhandenen bzw. beobachteten Möglichkeiten.

Chemischer Vorgang		Beobachtet		Beobachter
		in der Leber	im Gesamtorganismus	
Oxydation zu Oxalsäure	$COH.COOH + O = \begin{matrix} COOH \\ \vert \\ COOH \end{matrix}$	fehlt[1]	nachweisbar[2]	[1] Schloß, Granstroem eig. Beob. [2] Pohl, Eppinger, Dakin, Adler
Oxydation zu Kohlensäure	$COH.COOH + O_2 = 2CO_2 + H_2O$	fehlt	nachweisbar	eig. Beob., Freise
Reduktion zu Glykolsäure	$COH - COOH + H_2 = CH_2OH.COOH$	"	—	eig. Beob.
Reduktion zu Essigsäure	$COH.COOH + 2H_2 = CH_3.COOH + H_2O$	"	—	"
Abbau zu Ameisensäure	$(COH.COOH + O = HCOOH + CO_2)$?	nachweisbar	nachweisbar	"
Bildung von Glykokoll	$COH.COOH + NH_3 - O = NH_2.CH_2.COOH$	nicht nachweisbar	—	"
Bildung von Allantoin	$\begin{matrix} COOH \\ \vert \\ CHO \end{matrix} + 2NH_2.CO.NH_2 = $ NH_2–CO–NH, NH–CH–NH ring: $\begin{matrix} NH_2 & & NH & \\ \vert & & / \ \backslash & \\ CO & & CO \quad CO & \\ \vert & & \vert \quad\ \vert & \\ NH & - & CH - NH & \end{matrix} + 2H_2O$	nicht untersucht	nachweisbar	Eppinger, Adler

Für die Leber ist somit der Abbau zu Ameisensäure am besten nachgewiesen. Er ist auch quantitativ nicht unbeträchtlich, wenn man bedenkt, daß eine Kaninchenleber von ca. 95 g Gewicht unter den Bedingungen des Durchblutungsversuches, die sicher minder günstig sind als im lebenden Tier, in 2 Stunden erwa 50 mg Ameisensäure bildet. Das würde in 24 Stunden 0,6 g bedeuten, wobei zu berücksichtigen ist, daß daneben noch andere Umwandlungsmöglichkeiten vorhanden sein können. In welcher Art diese Ameisensäurebildung erfolgt, muß noch dahingestellt bleiben. Die einfachste Annahme wäre die in obiger Tabelle angedeutete — Spaltung der Glyoxylsäure unter Kohlensäure- und Ameisensäurebildung. Der Verlauf könnte aber auch anders erfolgen, z. B. unter Formylanlagerung zustande kommen, nach Analogie der Acetylierung auf Kosten der Brenztraubensäure[1]).

$$CHO.COOH + NH_2.R = CHO - NH.R + CO_2.$$

Da bei der von mir benutzten Destillation mit Phosphorsäure eine Abspaltung von Formylgruppen denkbar ist, so bleibt noch zu untersuchen, ob die gefundene Ameisensäure nicht aus Formylverbindungen herstammt. Daß bei Verfütterung von Glyoxylsäure im Harn die Ameisensäure wiederholt vermißt wurde, ist im Hinblick auf die nicht unbeträchtliche Angreifbarkeit der Ameisensäure im lebenden Organismus verständlich.

Die Vermutung, daß die Glyoxylsäure eine Durchgangsstufe bei der Bildung des Glykokolls darstellt, findet in den bisher vorliegenden Versuchen keine Stütze.

---

[1]) Vgl. Knoop, H. S. **67**, 498.

Experimentelle Beiträge zur Frage des Schicksals tiefabgebauter Eiweißkörper im Darmkanal. I.

Von

Peter Rona.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 31. Januar 1912.)[1]

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben erwiesen, daß die Eiweißkörper im Darmkanal eine sehr weitgehende, wenn nicht vollkommene Spaltung erleiden, und daß der tierische Organismus befähigt ist, mit den tiefsten Abbauprodukten der Eiweißkörper, den Aminosäuren, seinen Eiweißbedarf zu decken. Über den Ort eines Wiederaufbaues zum Eiweiß aus den tiefen Spaltprodukten gehen die Ansichten noch auseinander. Nach Abderhalden erfolgt die Synthese während der Resorption bereits in der Darmwand, und er konnte auch gute Gründe für diese Ansicht anführen, während nach anderen diese Ansicht, die einen neuerlichen Ab- und Aufbau in den Körperzellen voraussetzt, zu kompliziert erscheint und ein direkter Transport der betreffenden Spaltprodukte zu den Organzellen ohne vorherigen Aufbau zu Serumeiweiß mehr Wahrscheinlichkeit für sich hat. Eine Entscheidung in dieser Frage kann natürlich nur das Experiment geben, und gerade in der jüngsten Zeit sind Beobachtungen mitgeteilt worden, die eher zugunsten der Ansicht sprechen, daß die Aminosäuren, wenigstens zum großen Teil, direkt, ohne vorherige Synthese, verwertet werden[2]).

---

[1]) Auf Wunsch des Verfassers kommt die Abhandlung erst jetzt zum Abdruck.

[2]) Vgl. hierzu O. Folin und W. Denis, Journ. of Biolog. Chem. 11, 86 u. 161, 1912; Buglia, Zeitschr. f. Biol. 58, 162, 1912.

Direkte Untersuchungen zur Lösung des Problems liegen jedoch nur spärlich vor. Einen orientierenden Versuch in dieser Richtung bildet die vorliegende Mitteilung. Es wurde untersucht, ob überlebende Darmschlingen von Katzen ein in der Nährlösung vorhandenes, bzw. in das Darmlumen eingeführtes Aminosäurengemisch im Sinne einer Synthese verändern. Brauchbare Resultate zu diesem Zwecke mußte die Bestimmung des Amino-Stickstoffes liefern, da eine eventuelle Synthese der Aminosäuren mit dem Verschwinden der Aminogruppen verbunden sein muß.

Ich benutzte hierzu die gasanalytische Methode von D. van Slyke[1]), die bei Einhaltung gewisser Kautelen zuverlässige Werte liefert. Katzendärme, die sich bei 38° in einer von Tyrode empfohlenen Nährlösung[2]) befanden, dienten als Versuchsobjekt; während der ganzen Dauer des Versuches (4 Stunden) perlte Sauerstoff durch die Lösung. Die Bewegung der Därme während der Versuchsdauer war eine ungemein rege, nur in den ersten 10 bis 15 Minuten nach dem Eintragen in die Nährlösung war in manchen Fällen eine gewisse Hemmung der Bewegung zu beobachten, nach dieser Zeit trat jedoch stets eine Erholung ein. In allen Versuchen betrug die Flüssigkeit 250 ccm. In einer Reihe von Versuchen wurde das Aminosäurengemisch der Nährlösung, in der die Darmschlinge sich befand, einfach zugefügt, und am Anfang und am Ende des Versuches wurde in je 100 ccm der Lösung der NH_2-N bestimmt. In den meisten Versuchen wurde jedoch das Aminosäurengemisch, dessen Gehalt an NH_2-N vorher genau ermittelt worden war, in die Darmschlinge selbst gebracht. Die

---

[1]) Journ. of Biolog. Chem. **9**, 185, 1911. Es wurde bei allen Bestimmungen vollkommen gleichmäßig gearbeitet, namentlich die Reaktion im Nitritgemisch genau 5 Minuten vor sich gehen gelassen.

[2]) Die Lösung ist folgendermaßen zusammengestellt: ClNa 8 g, KCl 0,2 g, $CaCl_2$ 0,2 g, $MgCl_2$ 0,1 g, NaH_2PO_4 0,05 g, $NaHCO_3$ 1,0 g, Dextrose 1,0 g Wasser zu 1 l. Ich benutzte die Lösung meist ohne Traubenzucker, da dieser die Bewegungen des Katzendarmes nicht fördert, wenn ich auch eine direkte Hemmung durch den Traubenzucker nicht beobachten konnte. Vgl. hierzu O. Cohnheim, Zeitschr. f. Biol. **38**, 432, 1899 und R. Magnus, Arch. f. d. ges. Physiol. **102**, 123, 1904.

Anordnung war so getroffen, daß in beiden Enden der Darmschlinge Glasröhren staken, an die der Darm angebunden war. Vom Magenende her wurde nun die Aminosäurenlösung (1 ccm) quantitativ unter Nachwaschen mit einigen Kubikzentimeter Tyrodelösung eingeführt (alle Flüssigkeiten hatten eine Temperatur von 38°), unter leichtem Druck mittels eines Gummiballons in das Darmlumen gebracht, dann die beiden oberen Enden der Glasröhren mittels Gummischlauch und Klemmschraube abgeschlossen, damit nicht der äußerst lebhaft sich bewegende Darm seinen Inhalt wieder in die Glasröhren (in denen ein geringer Überdruck herrschte) austreiben sollte. Nach Abschluß des Versuches wurde der mit der möglichsten Sorgfalt gewonnene Darminhalt und die „Außenflüssigkeit" getrennt auf NH_2-N untersucht. (In den Versuchen mit „innen" und „außen" bezeichnet.) Als Aminosäurengemisch wurden in einigen Versuchen die Produkte der Salzsäurehydrolyse von Casein benutzt, in einem die der H_2SO_4-Hydrolyse, in den meisten Versuchen jedoch durch kombinierten, totalen, fermentativen Abbau mittels Pepsin und Trypsin gewonnenes Verdauungsgemisch von Rindfleisch. Die für je einen Versuch gebrauchte Aminosäurenmenge wurde so gewählt, daß sie etwa 15 mg NH_2-N entsprach, während das Gewicht der nach dem Versuch lufttrocken gewogenen Darmstücke 15 bis 25 g betrug. Vor der Benutzung wurde die Lösung der Aminosäuren gegen Lackmus genau neutralisiert. Die Darmschlingen wurden vor Eintragung in die Nährlösung so lange mit Tyrodescher Lösung von 38° ausgespült, bis diese vollkommen rein abfloß. Die Tiere hatten 1 bis 2 Tage vor dem Versuch gehungert. — In einer Reihe von Versuchen wurden ferner nicht die gesamten hydrolytischen Abbauprodukte einer Eiweißart benutzt, sondern ein künstliches Gemisch von verschiedenen Aminosäuren; in einem Versuch wurde nur d-l-Alanin gegeben.

Kontrollversuche haben nun ergeben, daß Darmschlingen, wenn sie in der Nährlösung bei 38° unter Sauerstoffzufuhr ihre Tätigkeit entfalten, in das Darmlumen eine geringe, aber sicher nachweisbare Menge von Amino-N abgeben. Bei diesen Versuchen wurden die Darmschlingen nach ihrem Verweilen in der Nährlösung (4 Stunden) aufgeschnitten, der Inhalt unter sorgfältigem Waschen der Schleimhaut gesammelt, dann die Flüssig-

keit zur Entfernung eventueller Eiweißspuren nach Michaelis und Rona mit Kaolin behandelt, auf ein passendes Volumen (15 bis 20 ccm) eingeengt und eine Hälfte nach van Slyke untersucht, die andere nach Sörensen der Formoltitration unterworfen. In beiden Fällen fanden sich deutliche Ausschläge, und die nach den beiden Methoden gewonnenen Werte sind von derselben Größenordnung. Die Übereinstimmung ist jedoch keine vollkommene, was nicht bloß auf die Kleinheit der absoluten NH_2-Mengen zurückzuführen ist (wodurch die methodischen Fehler stärker hervortreten), sondern wohl auch darauf, daß wir es hier offenbar mit einem Gemisch von Körpern zu tun haben, die nicht alle gleichmäßig bei der van Slykeschen und bei der Sörensenschen Methode reagieren. In Betracht kommen hier außer Aminosäuren hauptsächlich Ammoniak, der auch, wenn auch langsam, mit salpetriger Säure reagiert, zu einem geringen Teil vielleicht auch Harnstoff. Weitere Untersuchungen, die bereits im Gange sind, müssen in dieser Hinsicht Aufklärung verschaffen.

Für die Beurteilung der nachfolgenden Versuchsergebnisse ist diese Tatsache jedenfalls zu berücksichtigen; sie mußte jedesmal in Rechnung gezogen werden. Dies geschah in der Weise, daß bei jeder Versuchsreihe mit Aminosäurengemisch ein Versuch („Kontrollversuch“) eingeschoben wurde, in welchem ein Darmstück von demselben Tier und möglichst von demselben Gewicht ohne Zufügen eines Aminosäurengemisches, aber sonst unter denselben äußeren Bedingungen untersucht wurde. Die in diesen Versuchen gefundene NH_2-N-Menge mußte von den bei dem Hauptversuch gewonnenen NH_2-N-Werten in Abzug gebracht werden, wenn man sich darüber Rechenschaft geben wollte, ob von der zugefügten NH_2-N-Menge etwas verschwunden war oder nicht. Zweifellos haftet diesem Vorgehen eine Unsicherheit an, da wir nicht wissen können, ob die Darmschlingen in den eigentlichen Versuchen ebenfalls dieselbe Amino-N-Menge abgegeben haben wie im Kontrollversuch. Aber, abgesehen davon, daß dieser die Versuchsresultate trübende Faktor nicht anders auszuschließen war, zeigen auch die unten angegebenen Versuche, daß die Anbringung dieser Korrektur durchaus berechtigt war. Im einzelnen verliefen die Versuche wie folgt.

Versuchs-Nr.	In die Darmschlinge eingeführte Menge NH_2·N mg	Wiedergefunden			Bemerkungen
		außen	innen	zusammen	
1	16,89	4,14	14,10	18,24	Zugeführtes Aminosäurengemisch durch Salzsäure-Hydrolyse von Casein gewonnen Darmgewicht: 15 g
2	—	1,26	3,21	4,47	Kontrollversuch zu 1 Darmgewicht: 14 g
3	16,84	6,02	12,71	18,73	Aminosäurengemisch nach HCl-Hydrolyse von Casein Darmgewicht: 13 g
4	16,84	7,24	13,03	20,27	Aminosäurengemisch nach HCl-Hydrolyse Darmgewicht: 14 g
5	—	1,50	2,68	4,18	Kontrollversuch zu 3 und 4 Darmgewicht: 14 g
6	15,25	4,02	14,57	18,59	Aminosäurengemisch nach HCl-Hydrolyse Darmgewicht: 13 g
7	—	1,08	3,32	4,40	Kontrollversuch zu 6 und 7 Darmgewicht: 14 g
9	15,60	9,69	10,40	20,09	Aminosäurengemisch nach HCl-Hydrolyse Darmgewicht: 12 g
10	15,60	8,54	13,21	21,75	Aminosäurengemisch nach HCl-Hydrolyse Darmgewicht: 15 g
11	—	2,04	3,69	5,73	Kontrollversuch zu 9 und 10 Darmgewicht: 13 g
12	16,55	2,30	14,40	16,70	Aminosäurengemisch nach H_2SO_4-Hydrolyse von Casein Darmgewicht: 12 g
13	16,55	2,53	13,70	16,23	Aminosäurengemisch nach H_2SO_4-Hydrolyse von Casein Darmgewicht: 13 g
14	—	0,66	2,11	2,77	Kontrollversuch zu 12 und 13 Darmgewicht: 12 g
15	14,50 g	3,45	14,2	17,65	Aminosäurengemisch durch Fermenthydrolyse von Rindfleisch gewonnen Darmgewicht: 14 g
16	14,5 g	2,48	13,0	15,48	Aminosäurengemisch durch Fermenthydrolyse von Rindfleisch gewonnen Darmgewicht: 14 g
17	—	1,18	2,54	3,72	Kontrollversuch zu 15 und 16 Darmgewicht: 16 g
18	14,80	4,23	15,1	19,33	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 14 g
19	14,80	5,05	13,8	18,85	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 15 g
20	—	1,50	5,3	6,80	Kontrollversuch zu 18 und 19 Darmgewicht: 13 g

Versuchs-Nr.	In die Darmschlinge eingeführte Menge NH_2-N mg	Wiedergefunden			Bemerkungen
		außen	innen	zusammen	
21	15,17	4,24	16,1	20,25	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse. Die Lösung enthält 0,5 mg Traubenzucker Darmgewicht: 13 g
22	—	1,06	5,01	6,07	Kontrollversuch zu 21. Darmgewicht: 13,5 g
23	16,43	5,45	13,90	19,35	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse. Mit 0,5 mg Traubenzucker Darmgewicht: 12 g
24	—	1,18	3,28	4,46	Kontrollversuch zu 23 Darmgewicht: 12 g
25	17,35	7,13	17,0	24,13	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 12 g
26	17,35	6,31	15,9	22,21	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 12 g
27	—	1,80	5,4	7,20	Kontrollversuch zu 25 und 26 Darmgewicht: 14 g
28	17,35	9,34	16,0	25,34	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 12 g
29	17,35	8,14	15,9	24,04	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 12 g
30	—	2,5	5,2	7,70	Kontrollversuch zu 28 und 29. Darmgewicht: 12 g
31	16,60	5,59	15,3	20,89	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 14 g
32	16,60	5,12	16,7	21,82	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 13 g
33	—	2,85	4,46	7,31	Kontrollversuch zu 31 und 32. Darmgewicht: 13 g
34	16,55	7,15	14,0	21,15	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 15 g
35	16,55	5,89	15,45	21,35	Aminosäurengemisch nach Fermenthydrolyse Darmgewicht: 16 g
36	—	1,92	2,31	4,23	Kontrollversuch zu 34 und 35 Darmgewicht: 18 g

Versuch Nr.	In der Nährlösung vorhanden an NH_2-N in mg		Bemerkungen
	vorher	nachher	
37	22,86	22,01	Das Aminosäurengemisch (aus HCl-Hydrolyse) zu der Nährlösung hinzugefügt. Darmgewicht: 20 g.
38	18,55	21,50	Wie im Versuch 37. Darmgewicht: 22 g.
39	19,86	19,44	Versuch ohne Darm.

Bei den Versuchen mit dem künstlichen Aminosäurengemisch wurde dieses zu der Nährlösung hinzugefügt und der Darm $3^1/_2$ bis 4 Stunden in der Lösung gelassen. Vor und nach dem Versuch wurde der Gehalt an NH_2-N bestimmt. In einigen Versuchen wurde so verfahren, daß die mit dem Aminosäurengemisch versetzte Nährlösung 20 bis 30 Minuten lang mit dem Darm belassen wurde. Die sich lebhaft bewegende Darmschlinge stößt dabei Epithelzellen, Schleim in das Medium, wodurch sich dieses mehr oder weniger trübt. Nach 20 bis 30 Minuten wurde dann der Darm aus dieser Lösung (a) in eine andere frische, mit dem Aminosäurengemisch versetzte Tyrodelösung (b) gehoben. In beiden Flüssigkeiten (a und b) wurde der NH_2-N vor und nach dem Versuch bestimmt. Das Aminosäurengemisch wurde in Tyrodescher Lösung aufgelöst; 100 ccm von dieser enthielten ca. 30 mg NH_2-N, davon entfielen auf Glykokoll 5 mg, auf d-Alanin 11 mg, auf l-Leucin 7 mg, d-l-Asparaginsäure 2 mg, auf d-l-Glutaminsäure 2 mg, auf d-l-Phenylalanin 3 mg.

Versuch Nr.	NH_2-N in 50 ccm Nährlösung in mg		Bemerkungen
	vorher	nachher	
40	14,76	16,72	Darmgewicht: 12,5 g
41	a) 15,53 b) 14,93	15,41 16,81	Darmgewicht: 11,0 g
42	15,16	15,39	Darmgewicht: 19 g
43	a) 14,92 b) 15,23	13,93 15,23	Darmgewicht: 19 g

Versu ch Nr.	NH_2-N in 50 ccm Nährlösung in mg		Bemerkungen
	vorher	nachher	
44	15,18	15,88	Darmgewicht: 21 g
45	15,19	16,79	Darmgewicht: 19 g
46	14,26	15,80	Darmgewicht: 23 g
47	a) 16,11 b) 16,73	16,17 16,25	Darmgewicht: 20 g

Im Versuch mit d-l-Alanin wurde diese Aminosäure ebenfalls der Tyrode-Lösung hinzugefügt und der Gehalt an NH_2-N vor und nach dem Versuch bestimmt. In einem zweiten Versuch wurde der Darm nach einem halbstündigen Verweilen in der alaninhaltigen Nährlösung (a) in eine frische Tyrode-Lösung (b) (mit Alanin versetzt) gehoben. Vor und nach dem Versuch wurde die NH_2-N-Menge bestimmt.

Versuch Nr.	NH_2-N in 100 ccm Nährlösung in mg		Bemerkungen
	vorher	nachher	
48	34,26	35,30	Darmgewicht: 15,5 g
49	a) 31,40 b) 33,00	31,18 34,20	Darmgewicht: 13,5 g

Überblicken wir die Ergebnisse der Versuchsreihe, so kann folgendes konstatiert werden. Erstens zeigt es sich, daß nach Abschluß der Versuche, bei welchen das Aminosäuregemisch in das Darmlumen eingeführt wurde, in dem den Darm umgebenden Medium stets größere Mengen Aminostickstoff vorhanden waren als im Kontrollversuch. Es mußte demnach ein Teil der Aminosäuren oder vorsichtiger ausgedrückt, des Aminostickstoffes, die Darmwand passiert haben.

Ferner findet man, daß die Menge des Aminostickstoffes im Darmlumen und in der Außenflüssigkeit zusammen genommen nicht weniger, sondern mehr geworden war als die eingeführte Menge des Aminostickstoffes, und dieses Mehr entspricht befriedigend dem Aminostickstoff im „Kontrollversuch". Ziehen wir diese Aminostickstoffmenge des Kontrollversuches von der Aminostickstoffmenge im Hauptversuch ab, so erhalten wir in be-

friedigender Genauigkeit die zugesetzte NH_2-Stickstoffmenge. Nur in wenigen Versuchen bekommen wir nach Abzug des Kontrollstickstoffes 2 bis 3 mg NH_2-N-Menge weniger als eingeführt wurde, eine Menge, die die Fehler der Methodik nicht übersteigen dürfte.

Der hauptsächlichste Einwand, den man gegen die Versuchsanordnung machen kann, ist, daß die Darmschleimhaut in dem überlebenden Darmstück nicht mehr funktionstüchtig war, denn die Intaktheit der motorischen Funktion beweist nichts für die Intaktheit der viel empfindlicheren Schleimhautschicht. Die reichliche Schleimproduktion, der ein massenhaftes Auftreten von Becherzellen im mikroskopischen Bild entspricht, könnte für eine Funktionstüchtigkeit der Schleimhaut sprechen. Aber zweifellos wird die Epithelschicht in einem Versuch von 4 Stunden arg angegriffen. Dafür spricht, daß desquammierte Epithelzellen massenhaft im Darmlumen liegen, und im mikroskopischen Bilde sieht man namentlich die Kuppen der Darmzotten von der Epithelschicht entblößt. In kürzer dauernden Versuchen von $2^1/_2$ bis 3 Stunden erscheint die Epithelschicht mikroskopisch jedoch fast ganz intakt, so daß man wenigstens während dieser Zeit von einer relativ normalen Epithelschicht sprechen könnte.

Die Versuche geben jedenfalls keine Anhaltspunkte für eine Synthese der Aminosäuren in der Darmwand. Man wird aber bei den Schlüssen, zu denen die Befunde auffordern, sehr vorsichtig sein müssen. Hoffentlich wird es gelingen, in künftigen Versuchen, die auch über die Natur des von den Därmen abgegebenen Aminostickstoffes Aufschluß geben sollen[1]), die Versuchsbedingungen zur Beantwortung des Problems günstiger zu gestalten. Die vorliegenden Versuche dürfen nur als orientierende angesehen werden[2]), und sie werden mit modifizierter Versuchsanordnung fortgesetzt.

---

[1]) Vgl. in dieser Richtung die Untersuchungen von O. Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 239, 1909; **61**, 189, 1909 (mit F. Makita); **76**, 293, 1912.

[2]) Anmerkung bei der Korrektur: In einer nach Abschluß dieser Versuchsreihe erschienenen Arbeit berichtet E. Abderhalden (Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 121) über mit P. Hirsch ausgeführte Versuche über Nachweis synthetischer Prozesse aus Aminosäuren bei verschiedenen Organen (Darm, Leber usw.). Auch da waren die Resultate durchweg negativ.

Daß übrigens ein Verbrauch des Aminosäurengemisches auch im Sinne einer Verbrennung durch den sich bewegenden Darm kaum stattfindet, dafür sprechen Beobachtungen, nach denen Aminosäuren und Aminosäurengemische nicht befähigt sind, die Bewegungen von überlebenden Darmstücken in den entsprechenden Salzlösungen anzuregen[1]).

[1]) Vgl. P. Rona und P. Neukirch, Arch. f. d. ges. Physiol. 146. 371, 1912.

Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1912.)

I.

Als Reagens der Polyphenoloxydasen wird häufig eine Mischung von α-Naphthol und p-Phenylendiamin benutzt, die durch oxydative Synthese Indophenolblau liefert. Dieses Reagens bietet ein besonderes Interesse, weil es mit den Tiergeweben positive Resultate gibt. Die anderen Polyphenoloxydasereagenzien, wie z. B. Guajactinktur, Hydrochinon, Phenolphthalein u. a., liefern mit der Mehrzahl der höheren Tiergewebe negative oder wenigstens zweifelhafte Resultate.

Die Oxydation des Indophenolreagens durch die Tiergewebe ist Gegenstand zahlreicher Arbeiten, namentlich mikrochemischer Untersuchungen, gewesen. Die verschiedenen diesbezüglichen Arbeiten sind von uns in einer jüngst erschienenen Abhandlung[1]) eingehend erörtert worden. Hier wollen wir uns lediglich auf die von Vernon erzielten Resultate beschränken, weil diese Versuche mit den unsrigen mehrere Berührungspunkte aufweisen.

Vernon hat über die Oxydation des Indophenolreagens durch die Tiergewebe eine Reihe von Arbeiten[2]) veröffentlicht. Gleich den anderen Forschern schreibt Vernon die Indophenolreaktion in den Tiergeweben

---

[1]) Battelli und Stern, Die Oxydationsfermente. Ergebnisse d. Physiol. 12, 96, 1912.

[2]) Vernon, The quantitative estimation of the indophenoloxidase of animal tissues. Journ. of Physiol. 42, 402, 1911. — Derselbe, The indophenoloxidase of mammalian and avian tissues. Ibid. 43, 96, 1911. — Derselbe, The relation between oxidase and tissue respiration. Ibid. 44, 150, 1912.

der Wirkung einer Oxydase zu, die er mit Kastle[1]) als eine Indophenoloxydase bezeichnet. Wir werden später erörtern, ob die Annahme berechtigt ist, daß es sich hier um eine wirkliche Oxydase handelt.

In seiner ersten Mitteilung beschäftigt sich Vernon hauptsächlich mit dem Studium der Wirkungsgesetze der Indophenoloxydase. Diese Gesetze sind je nach der Konzentration des Substrats, den verschiedenen Geweben, dem Gewichte derselben usw. verschieden.

In der zweiten Arbeit untersucht Vernon eine große Anzahl von Geweben von Säugetieren, Vögeln, Kaltblütern usw. in bezug auf ihr Oxydationsvermögen.

In seiner dritten Arbeit untersucht der Verfasser den Einfluß, den die verschiedenen Faktoren, wie höhere Temperaturen, Säuren und Alkalien, Gifte usw., auf die Atmung der Niere einerseits und die Oxydationswirkung der Gewebe auf das Indophenolreagens anderseits ausüben.

Wir werden noch Gelegenheit haben, auf diese Arbeiten von Vernon zurückzukommen, sei es, um die Resultate dieses Forschers mit den nach unserer Methode erzielten zu vergleichen, sei es, um die verschiedenen von Vernon aufgestellten Hypothesen zu erörtern.

Wir müssen hier noch eine von Pighini[2]) letzthin veröffentlichte Arbeit, die nach der Veröffentlichung unserer Sammelarbeit über die Oxydationsfermente erschienen ist, erwähnen. Pighini hat vom mikrochemischen Standpunkte aus das Oxydationsvermögen des Zentralnervensystems mehrerer Wirbeltiere mit Hilfe des Indophenolreagens untersucht. Es würde den Rahmen unserer Arbeit überschreiten, die von Pighini erzielten Resultate eingehender zu erörtern. Wir begnügen uns, darauf hinzuweisen, daß Pighini auch die Beobachtung gemacht hat, daß die Tela chorioidea ein sehr starkes Oxydationsvermögen besitzt. Auch die Cerebrospinalflüssigkeit gibt eine positive Indophenolreaktion.

In unseren Untersuchungen verwenden wir an Stelle des Indophenolreagens das p-Phenylendiamin. Wir werden sehen, daß alle Tiergewebe die Fähigkeit aufweisen, das p-Phenylendiamin zu oxydieren. In einer früheren Arbeit[3]) hatten wir die Beobachtung gemacht, daß alle Tiergewebe auch die Fähigkeit haben, die Bernsteinsäure zu oxydieren. Es schien uns also von Interesse, die Oxydation dieser beiden Substanzen durch die Tiergewebe parallel zu untersuchen, um entscheiden zu können, ob der die p-Phenylendiaminoxydation beschleunigende

---

[1]) Kastle, The oxidases and other oxygen-catalyst concernend in biological oxidations. Hygien. Lab. Washington 1909, Bull. Nr. 59.

[2]) Pighini, Über die Indophenoloxydase im Zentralnervensystem, in der Tela chorioidea und in der Cerebrospinalflüssigkeit. Diese Zeitschr. 42, 124, 1912.

[3]) Battelli und Stern, Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. Diese Zeitschr. 30, 172, 1910.

Katalysator mit dem die Bernsteinsäure oxydierenden identisch sei.

Wir haben in einigen Versuchen das Dimethyl-p-Phenylendiamin benutzt. Diese Substanz wird von den Tiergeweben nicht so leicht angegriffen wie das p-Phenylendiamin und weist mithin keinen Vorteil gegenüber dem p-Phenylendiamin auf. Wir haben außerdem das m- und o-Phenylendiamin untersucht. Wie zu erwarten war, wird das o-Phenylendiamin weniger energisch oxydiert als das p-Phenylendiamin; das m-Phenylendiamin wird fast gar nicht angegriffen.

II. Die Nachteile des Indophenolreagens. Vorteile der Anwendung von p-Phenylendiamin.

Das Indophenolreagens bietet mehrere ernstere Nachteile, die dasselbe für das Studium mehrerer Fragen untauglich machen.

Einer dieser Nachteile besteht darin, daß das in der Reagensmischung enthaltene p-Phenylendiamin von den Geweben sehr leicht oxydiert wird. Die Folge hiervon ist, daß je nach den Versuchsbedingungen ein kleinerer oder größerer Teil des p-Phenylendiamins oxydiert wird, ohne zur Bildung von Indophenolblau zu führen. Nun ist es sehr wahrscheinlich, daß der die p-Phenylendiaminoxydation beschleunigende Katalysator mit dem die Indophenolbildung bewirkenden identisch sei. Die Indophenolreaktion wird also hierdurch gestört sein. Dieser Nachteil wird um so ernster, je höher die Temperatur ist, bei der der Versuch ausgeführt wird, weil unter diesen Bedingungen die Oxydation des p-Phenylendiamins bedeutend ansteigt. Man erzielt auf diese Weise das bereits von Vernon beobachtete und auf den ersten Blick paradoxal scheinende Resultat, daß die Indophenolreaktion in den Tiergeweben schneller bei 18° als bei 40° verläuft.

Ein weiterer störender Umstand bei der Verwendung des Indophenolreagens ist, daß das α-Naphthol eine die Oxydationserscheinungen stark hemmende Substanz ist. Infolge dieser Giftigkeit des α-Naphthols sinkt die Indophenolreaktion in den Tiergeweben auf sehr geringe Werte herab oder kann auch vollständig fehlen, sobald das Reagens eine etwas stärkere Konzentration erreicht (α-Naphthol in einer Konzentration von

0,5 : 100 z. B.). Daraus folgt, daß man den Einfluß der Konzentration des Reagens nur in sehr beschränktem Maße studieren kann. Die Gewebe können auf diese Weise nur relativ kleine Mengen des Reagens oxydieren.

Ein anderer Nachteil des Indophenolreagens besteht in der leichten Entfärbung desselben durch die Einwirkung verschiedener in den Geweben enthaltener Substanzen, wahrscheinlich reduzierenden Charakters. So findet Vernon, daß bei mehreren Tierarten die Leber und die Niere, die besonders reich an entfärbenden Substanzen sind, ein sehr geringes Oxydationsvermögen aufweisen, während im Gegenteil diese Gewebe, wie wir weiter unten sehen werden, das p-Phenylendiamin sehr energisch oxydieren.

Die Verwendung des p-Phenylendiamins weist gegenüber der Indophenolreaktion mehrere Vorzüge auf. Diese Substanz hat nur den Nachteil, daß das Oxydationsprodukt durch die in den Geweben enthaltenen Substanzen entfärbt werden kann. Doch ist diese Entfärbung viel geringer als die bei der Indophenolreaktion beobachtete. Da man außerdem sehr große Mengen dieses Reagens verwenden kann, so ist die entfärbende Wirkung der Gewebe weniger störend als bei der Indophenolreaktion. Im übrigen haben wir in der Mehrzahl unserer Versuche die Oxydation des p-Phenylendiamins durch Bestimmung der verbrauchten Sauerstoffmenge gemessen, die durch die Gegenwart der entfärbenden Substanzen nicht merklich beeinflußt wird.

III. Methode.

Allgemeine Methode. Die allgemeine Methode ist im Grunde dieselbe, die wir in unseren früheren Untersuchungen über die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Tiergewebe benutzt haben. Die zerriebenen Gewebe werden mit Wasser versetzt, in große Flaschen gebracht und in einer reinen Sauerstoffatmosphäre energisch geschüttelt. Eine Flasche dient als Kontrollprobe, während die andere Flasche die nötige Menge p-Phenylendiamin erhält. Während der ganzen Versuchsdauer tauchen die Flaschen in ein Wasserbad von konstanter Temperatur. Am Schlusse des Versuches wird untersucht, ob das p-Phenylendiamin in Gegenwart des Gewebes eine Oxydation erlitten hat.

Die Oxydation des p-Phenylendiamins kann auf zwei verschiedene Arten bestimmt werden: entweder durch Messung der absorbierten Sauerstoffmenge, oder durch colorimetrische Bestimmung des Oxydationsprodukts.

Bestimmung der Oxydationsintensität des p-Phenylendiamins durch Messung der aufgenommenen Sauerstoffmenge. In der Mehrzahl unserer Versuche wurde die quantitative Bestimmung der Oxydation des Phenylendiamins in der Weise ausgeführt, daß die durch Zusatz dieser Substanz zu einem gegebenen Gewebe bewirkte Steigerung der Sauerstoffaufnahme volumetrisch gemessen wurde. Da die Gewebe eine ihnen eigentümliche Atmung aufweisen, war es notwendig, durch Versuche zu bestimmen, ob das Phenylendiamin auf diese Atmung einen Einfluß ausübt. Außerdem mußte vorher bestimmt werden, welche Werte die spontane Oxydation des Phenylendiamins in unserer Versuchsanordnung erreichen kann.

Wir haben die Beobachtung gemacht, daß das Phenylendiamin auf die eigentliche Atmung der Gewebe in derselben Weise einwirkt, wie die Bernsteinsäure. Auf die akzessorische Atmung bleibt das Phenylendiamin ohne Einfluß. Die Oxydation des Phenylendiamins summiert sich einfach mit den andern oxydativen Vorgängen der akzessorischen Atmung. Dies ist z. B. der Fall für die Leber oder die Niere, die ihre Hauptatmung bereits verloren haben.

Die Hauptatmung der Gewebe wird durch Zusatz von Phenylendiamin stark herabgesetzt, und zwar um so stärker, je größer die Konzentration dieser Substanz ist. Man muß also Gewebe verwenden, in denen die Hauptatmung bereits verschwunden ist.

Alle Gewebe, mit Ausnahme der Muskeln, haben 5 bis 6 Stunden nach dem Tode des Tieres ihre Hauptatmung eingebüßt. Wenn es sich also um irgendein Gewebe, mit Ausnahme des Muskels, handelt, genügt es, dasselbe ohne weitere Vorbehandlung 5 bis 6 Stunden nach dem Tode des Tieres zu verwenden, um die Hauptatmung völlig auszuschalten.

Die Muskeln bewahren hingegen einen großen Teil ihrer Hauptatmung oft 24 Stunden und noch länger nach dem Tode des Tieres. Um in denselben die Hauptatmung zu vernichten, kann man den fein zerriebenen Muskel mehrere Stunden bei Zimmertemperatur lassen. Aber das weitaus beste Verfahren besteht darin, das fein zerriebene Muskelgewebe zwei- bis dreimal mit Wasser zu extrahieren und jedesmal durch ein Leinwandtuch energisch auszupressen. Man erhält auf diese Art einen Rückstand, der keinen merklichen Gaswechsel mehr aufweist, hingegen aber die Fähigkeit besitzt, Phenylendiamin energisch zu oxydieren. Die Oxydationswirkung des Muskelrückstandes wird durch wiederholtes Auswaschen desselben nicht merklich herabgesetzt.

Die Fortdauer des Oxydationsvermögens. Wir haben die Beobachtung gemacht, daß das Oxydationsvermögen in den verschiedenen Geweben, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, 24 Stunden lang intakt bleibt. Es ist also durchaus nicht notwendig, zu den Versuchen sehr frische Gewebe zu benutzen.

Das Pankreas bildet hiervon eine Ausnahme. Dieses Organ, 1 oder 2 Stunden nach dem Tode des Tieres entnommen, oxydiert energisch Phenylendiamin und Bernsteinsäure, wenn man aber das Pankreas 24 Stunden bei einer Temperatur von 16° läßt, so verliert es häufig

diese Fähigkeit fast vollständig. Diese Erscheinung kann dem Umstande zugeschrieben werden, daß die im Pankreas enthaltenen Zymogene in lösliche Fermente übergehen, die den Katalysator der Phenylendiaminoxydation zerstörten, wie wir es weiter unten sehen werden.

Zubereitung der Gewebe in frischem Zustande. Diese Zubereitung ist sehr einfach. In Anbetracht der früher mitgeteilten Beobachtungen wird das Gewebe erst 5 bis 6 Stunden nach dem Tode des Tieres entnommen, in einer Fleischhackmaschine fein zerrieben und mit Wasser versetzt, so daß ein flüssiges Gemenge entsteht (z. B. 120 ccm Wasser für je 20 g Gewebe). Der Muskel kann in derselben Weise zubereitet werden, doch ist es vorteilhafter, denselben vorher mit Wasser mehrere Male auszuwaschen und den auf diese Weise erhaltenen Rückstand zu verwenden.

Zubereitung des Muskelrückstandes. Zu je 30 g fein zerriebenen Muskelgewebes (oder Herzmuskel) fügt man 150 ccm Wasser hinzu, schüttelt 5 Minuten lang durch und preßt das Ganze durch ein Leinwandtuch. Zum Muskelrückstand fügt man von neuem 150 ccm Wasser hinzu und preßt dann durch ein Leinwandtuch. Diese Prozedur kann mehrere Male wiederholt werden, ohne daß der Muskelrückstand seine Oxydationsfähigkeit merklich einbüßt. Ein zweimaliges Auswaschen ist jedoch hinreichend, um die eigentliche Atmung des Muskels aufzuheben, so daß der gesamte nach Phenylendiaminzusatz aufgenommene Sauerstoff zur Oxydation des Phenylendiamins verbraucht wird.

Zum ausgewaschenen Muskelrückstande fügt man die nötige Menge Wasser hinzu (z. B. 100 ccm), so daß eine Gewebesuspension erzielt wird. 30 g Muskel liefern ungefähr 20 g Muskelrückstand.

Spontane Oxydation des Phenylendiamins. Eine 1%ige wässerige Phenylendiaminlösung oxydiert sich nur sehr langsam, wenn man sie bei einer Temperatur von 40° in einer reinen Sauerstoffatmosphäre schüttelt. So nehmen 100 ccm dieser Lösung unter diesen Versuchsbedingungen nur 2 bis 3 ccm Sauerstoff im Laufe einer Stunde auf.

Die Oxydation des Phenylendiamins wird beträchtlich gesteigert, sobald etwas Alkali, selbst in geringster Konzentration, hinzugesetzt wird. So erhält man für 100 ccm einer 1%igen p-Phenylendiaminlösung beim Schütteln in einer reinen Sauerstoffatmosphäre bei einer Temperatur von 40° folgende Werte für den im Laufe einer Stunde aufgenommenen Sauerstoff.

Gewöhnliches Wasser:		Sauerstoffaufnahme: 2 ccm
NaOH	1 : 10000	„ 17 „
NaOH	1 : 5000	„ 24 „
NaOH	1 : 2000	„ 27 „
NaOH	1 : 1000	„ 31 „
NaOH	2 : 1000	„ 34 „

Man ersieht hieraus, daß in dem Maße, wie die Alkalinität zunimmt, die spontane Oxydation des p-Phenylendiamins steigt, doch steht diese Steigerung in keinem direkten Verhältnis zur NaOH-Konzentration.

Diese Wirkung geringer Alkalimengen auf die Oxydation des p-Phenylendiamins läßt sich in Gegenwart der Gewebe nicht beobachten, wie wir es bei der Untersuchung über den Einfluß der Reaktion des Mediums sehen werden. In Gegenwart der Gewebe werden die freien OH-Ionen gebunden und die potentiell gewordene Alkalinität übt auf die Oxydation des p-Phenylendiamins keinen Einfluß aus. Immerhin empfiehlt es sich, in den Versuchen betreffend die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe kein Alkali hinzuzusetzen, um jede Möglichkeit einer Fehlerquelle auszuschließen.

Berechnung der oxydierten p-Phenylendiaminmenge. Die Menge des bei der Oxydation des p-Phenylendiamins aufgenommenen Sauerstoffes gestattet einen Schluß auf die Menge der oxydierten Substanz. In unseren Versuchen haben wir die Beobachtung gemacht, daß bei der Oxydation von 1 g p-Phenylendiamin durch den Muskel oder das Gehirn ungefähr 150 ccm Sauerstoff verbraucht werden, berechnet bei 0° und bei einem Druck von 760 mm.

Bestimmung der Oxydationsintensität des p-Phenylendiamins mit Hilfe der colorimetrischen Methode. Um das Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins quantitativ bestimmen zu können, haben wir ein colorimetrisches Verfahren ausgebildet, das hauptsächlich darin besteht, das Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins in Aceton aufzulösen und nach Zusatz genügender Alkalimengen die Färbungsintensität der Lösung mit der einer Standardlösung zu vergleichen.

Zur Bereitung der Standardlösung läßt man 0,02 g p-Phenylendiamin in Gegenwart von Muskelrückstand völlig oxydieren. Zu 2 g Muskelrückstand fügt man 0,02 g p-Phenylendiamin und 10 ccm Wasser hinzu und schüttelt das Ganze in einer Sauerstoffatmosphäre bei 40°, bis sämtliches Phenylendiamin oxydiert ist, was ungefähr im Laufe von $1^1/_2$ Stunden erreicht wird. Man versetzt sodann das Reaktionsgemisch mit 90 ccm Aceton, läßt einige Minuten unter häufigem Schütteln in Kontakt und filtriert. Man alkalisiert mit einigen Tropfen einer 1%igen NaOH-Lösung, und man erhält auf diese Weise eine schön rot gefärbte Lösung. Diese Standardfärbung entspricht einer Lösung des Oxydationsproduktes von 0,02 g p-Phenylendiamin in 100 ccm Flüssigkeit (90 ccm Aceton und 10 ccm Wasser). Diese Standardlösung läßt sich wochenlang intakt aufbewahren. Die Färbungsintensität der Standardlösung kann durch Verdünnen mit Aceton vermindert werden. Doch darf die Verdünnung nicht allzuweit gehen, weil dann die rote Farbe durch eine mehr oder weniger gelbliche Tönung ersetzt wird, die den Vergleich der Färbung mit den anderen Lösungen sehr unsicher macht.

Bei der colorimetrischen Messung des Oxydationsproduktes des p-Phenylendiamins in Gegenwart eines Gewebes empfiehlt es sich vorerst festzustellen, ob das Oxydationsprodukt in großer oder kleiner Menge vorhanden ist. Wenn es sich um geringe Quantitäten handelt, muß man nur wenig Aceton, z. B. 1,5 Volumen, hinzusetzen, damit die Farbe der Acetonlösung rot ist und mit der Farbe der Standardlösung verglichen werden kann. Ist das Oxydationsprodukt reichlich, so kann

man natürlich die nötige Acetonmenge hinzufügen, um das gesamte Oxydationsprodukt in Lösung zu bringen.

Die auf diese Weise erhaltene Lösung muß mit NaOH alkalisch gemacht werden, bevor man sie mit der Standardlösung vergleichen kann. In der Tat verleihen mehrere Gewebe, wie z. B. die Leber, der Muskel des Kaninchens u. a., der Acetonlösung eine mehr oder weniger dunkle braune Färbung, die die rote Farbe maskiert. Diese Braunfärbung verschwindet völlig nach Alkalisation der Lösung.

Einfluß der entfärbenden Substanzen. Die Gewebe enthalten mehr oder minder große Quantitäten von Substanzen, die das Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins entfärben, wie sie auch das Indophenolblau entfärben. Diese Substanzen sind namentlich in der Leber in großer Menge enthalten. Es ist wahrscheinlich, daß es sich hier um reduzierende Körper handelt, doch haben wir diesen Punkt nicht speziell untersucht. Vernon spricht die Vermutung aus, daß die Entfärbung des Indophenolblaus durch die Gewebe entweder durch Reduktion unter dem Einflusse reduzierender Substanzen oder durch eine tiefergehende Oxydation des Indophenols zustande kommt.

Die das Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins entfärbenden Substanzen bilden natürlich einen störenden Faktor bei der colorimetrischen Bestimmung der Oxydationsintensität, namentlich wenn diese Substanzen in großer Menge vorhanden sind, wie es z. B. in der Leber der Fall ist. Immerhin, wenn die Mengen des oxydierten p-Phenylendiamins sehr groß sind, wie es in der Mehrzahl unserer Versuche der Fall war, bewirken die in den Geweben enthaltenen entfärbenden Substanzen nur eine geringe Abweichung bei der colorimetrischen Bestimmung des Oxydationsproduktes.

Die Gegenwart dieser entfärbenden Substanzen bewirkt keine Änderung der Menge des zur Oxydation des p-Phenylendiamins verbrauchten Sauerstoffes. So beträgt z. B. die zur vollständigen Oxydation von 0,20 g p-Phenylendiamin verbrauchte Sauerstoffmenge 30 ccm, gleichgültig, ob diese Oxydation durch die Einwirkung der Leber, der Muskeln oder des Gehirns stattgefunden hat.

Die Menge der entfärbenden Substanzen des Gehirns und der Muskeln ist ziemlich gering, so daß die colorimetrische Methode hier gute Resultate liefert. Die Niere und noch mehr die Leber enthalten hingegen große Mengen entfärbender Substanzen, so daß bei Benutzung dieser Gewebe einzig und allein die direkte Messung des aufgenommenen Sauerstoffes die Menge des oxydierten p-Phenylendiamins genau bestimmen kann.

Beständigkeit der Versuchsbedingungen. Mehrere Faktoren üben einen bedeutenden Einfluß auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Gewebe aus. Alle diese Faktoren müssen konstant gehalten werden, um untereinander vergleichbare Resultate betreffend die Oxydationsenergie der verschiedenen Gewebe zu erzielen. Unter den in Betracht kommenden Versuchsbedingungen sind vor allem die Dauer des Schüttelns, die Temperatur des Thermostaten, der osmotische Druck

die Reaktion des Mediums, die Konzentration des p-Phenylendiamins und die Sauerstoffspannung wichtig.

Die Menge des oxydierten p-Phenylendiamins hängt natürlich von der Dauer des Schüttelns ab. In den Versuchen, betreffend die Oxydationsenergie der verschiedenen Gewebe, betrug die Dauer des Schüttelns durchweg $^1/_2$ Stunde.

Die Temperatur des Thermostaten betrug in allen Versuchen 38° bis 40°.

An Stelle des gewöhnlichen Wassers wurde eine NaCl-Lösung von 3 : 1000 benutzt, da die Gegenwart von NaCl die Oxydation begünstigt, wie wir später sehen werden. Zu je 20 g Gewebe fügte man 100 ccm Flüssigkeit hinzu.

Das hinzugesetzte p-Phenylendiamin muß im Überschuß sein, so daß am Ende des Versuches ein Teil des p-Phenylendiamins unverändert zurückbleibt. Anderseits übt die Konzentration des p-Phenylendiamins einen gewissen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit aus. In der Mehrzahl unserer Versuche haben wir 1 g p-Phenylendiamin für je 20 g Gewebe benutzt.

Die Sauerstoffspannung hat ebenfalls einen merklichen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit des p-Phenylendiamins. In der Mehrzahl unserer Versuche waren die das Reaktionsgemisch enthaltenden Flaschen mit fast reinem Sauerstoff gefüllt. Man verfährt hierbei auf folgende Art: Nachdem die Gewebesuspension in die Flasche hineingebracht wurde, wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe schnell evakuiert und darauf die Flasche mit einem Sauerstoffbehälter in Verbindung gebracht.

Die Oxydationsprodukte des p-Phenylendiamins. Die Oxydationsprodukte des p-Phenylendiamins sind verschieden und im allgemeinen wenig bekannt. Wir haben keine besonderen Untersuchungen angestellt, um vom chemischen Standpunkte aus die Zusammensetzung des unter der Einwirkung der Tiergewebe entstandenen Oxydationsproduktes des p-Phenylendiamins zu erforschen.

IV. Oxydationsenergie der verschiedenen Gewebe gegenüber p-Phenylendiamin und Bernsteinsäure.

Mit Hilfe der soeben beschriebenen Methoden haben wir die Intensität der p-Phenylendiaminoxydation in den verschiedenen Geweben untersucht. Die Gewebe wurden teils aus dem Schlachthofe bezogen, teils stammten sie von durch Verbluten getöteten Laboratoriumstieren. Die Gewebe gelangten 5 Stunden nach dem Tode des Tieres zur Verwendung. Die fein zerriebenen Gewebe wurden in der früher beschriebenen Weise behandelt. Das fein zerriebene Muskelgewebe wurde wiederholt mit Wasser ausgewaschen, wie wir es bereits erwähnt haben.

An die Seite der Versuchsergebnisse betreffend die Oxydation des p-Phenylendiamins haben wir die Resultate, die sich auf die Bernsteinsäureoxydation beziehen, gesetzt.

In all diesen Versuchen fügt man zum fein zerriebenen Gewebe gewöhnliches Wasser hinzu, und zwar auf je 20 g Gewebe 100 ccm Wasser und 1 g p-Phenylendiamin, resp. 2 g bernsteinsaures Natrium.

In der Tabelle I sind die Durchschnittswerte der durch die Oxydation des p-Phenylendiamins oder der Bernsteinsäure bewirkten Steigerung des Sauerstoffverbrauches wiedergegeben. Jeder der hier angeführten Werte entspricht einem Mittelwerte von mindestens 5 Versuchen, d. h. er bezieht sich auf das Gewebe von 5 Individuen derselben Gattung. Die Kohlensäurewerte sind fortgelassen, da bei der Oxydation des p-Phenylendiamins oder der Bernsteinsäure keine Kohlensäurebildung stattfindet.

Tabelle I.

Durchschnittswerte der durch die Oxydation des p-Phenylendiamins resp. der Bernsteinsäure unter dem Einflusse von 100 g Gewebe bewirkten Steigerung der Sauerstoffaufnahme. Die hier angeführten Werte bezeichnen die Anzahl der Kubikzentimeter Sauerstoff, bei 0° und 760 mm Druck berechnet. In allen Versuchen betrug die Dauer des Schüttels 30 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 39°, die Flaschen waren mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Substanz	Gewebe	Pferd	Rind	Hammel	Hund	Kaninchen
p-Phenylendiamin .	Muskel	165	150	155	170	70
Bernsteinsäure . .	„	150	135	145	155	60
p-Phenylendiamin .	Herz	—	—	185	195	—
Bernsteinsäure . .	„	—	—	175	185	—
p-Phenylendiamin .	Leber	120	90	110	180	120
Bernsteinsäure . .	„	160	135	165	170	140
p-Phenylendiamin .	Niere	110	125	—	125	—
Bernsteinsäure . .	„	130	150	—	135	—
p-Phenylendiamin .	Gehirn	—	—	215	225	—
Bernsteinsäure . .	„	—	—	95	85	—
p-Phenylendiamin .	Weiße Subst.	—	—	110	—	—
Bernsteinsäure . .	„ „	—	—	75	—	—
p-Phenylendiamin .	Graue Subst.	—	—	240	—	—
Bernsteinsäure . .	„ „	—	—	110	—	—
p-Phenylendiamin .	Milz	55	40	60	45	—
Bernsteinsäure . .	„	40	30	45	35	—
p-Phenylendiamin .	Lunge	45	—	40	45	—
Bernsteinsäure . .	„	35	—	35	30	—
p-Phenylendiamin .	Pankreas	75	70	70	65	—
Bernsteinsäure . .	„	65	55	75	50	—

Aus den in der Tabelle I angeführten Zahlen läßt sich die Menge der oxydierten Substanzen berechnen. 1 g p-Phenylendiamin verbraucht zur Oxydation ungefähr 150 ccm Sauerstoff; 1 g Bernsteinsäure verbraucht ungefähr 95 ccm Sauerstoff, um zu Apfelsäure oxydiert zu werden.

Wir haben außerdem die Muskeln der Taube und des Huhnes untersucht und beim Kalb das Oxydationsvermögen der wenig gefärbten Schenkelmuskeln mit dem der Zwerchfellmuskeln verglichen. Wir haben unter den soeben mitgeteilten Versuchsbedingungen folgende Durchschnittswerte erzielt:

Muskeln von Taube:

p-Phenylendiamin . . .	215 ccm
Bernsteinsäure	195 „

Blasse Muskeln des Thorax von jungem Huhn:

p-Phenylendiamin . . .	55 ccm
Bernsteinsäure	40 „

Muskeln der hinteren Extremitäten von jungem Huhn:

p-Phenylendiamin . . .	120 ccm
Bernsteinsäure	105 „

Schenkelmuskeln des Kalbes:

p-Phenylendiamin . . .	105 ccm
Bernsteinsäure	65 „

Zwerchfellmuskeln des Kalbes:

p-Phenylendiamin . . .	200 ccm
Bernsteinsäure	170 „

Wie wir bereits gesagt haben, stellen die angeführten Werte Durchschnittszahlen dar. Im allgemeinen sind die individuellen Unterschiede nicht groß und überschreiten kaum 30 %. Immerhin gibt es auch hier Ausnahmen, und in einigen allerdings sehr seltenen Fällen beobachtet man, daß anscheinend normale Gewebe die Hälfte oder noch weniger des gewöhnlichen Oxydationsvermögens aufweisen. Ähnliche Resultate haben wir bei der Untersuchung über die Oxydation der Bernsteinsäure zu verzeichnen gehabt.

Wir sehen hier vor allem, daß alle daraufhin untersuchten Gewebe in recht hohem Grade die Fähigkeit besitzen, p-Phenylendiamin sowie Bernsteinsäure zu oxydieren. Anderseits weiß

man, daß mehrere Substanzen, wie z. B. Xanthin, Harnsäure, Alkohol u. a., nur durch bestimmte Gewebe oxydiert werden, während andere Gewebe, wie z. B. die Muskeln, das Gehirn u. a., diese Substanzen nicht angreifen.

Im allgemeinen ist die Oxydation des p-Phenylendiamins hauptsächlich im Gehirn, im Herzen, in den roten Muskeln, sowie in der Niere und der Leber sehr intensiv. Das Pankreas, die blassen Muskeln und hauptsächlich die Milz und die Lunge besitzen ein weit schwächeres Oxydationsvermögen.

Die weiße Hirnsubstanz oxydiert weniger energisch als die graue Hirnsubstanz. Pighini[1]) hat beobachtet, daß die weiße Hirnsubstanz des Menschen die Indophenolreaktion nicht gibt. Wie wir aber gesehen haben, weist die weiße Hirnsubstanz des Hammels ein beträchtliches Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin auf. Ähnliche Resultate haben wir mit dem Gehirn zweier durch Unfall verstorbener Personen erzielt.

Man kann beobachten, daß im großen und ganzen die verschiedenen Säugetiere keine erheblichen Unterschiede in bezug auf das Oxydationsvermögen eines gegebenen Gewebes aufweisen. Immerhin ist die Oxydationsfähigkeit der Hundeleber bei weitem größer als die aller anderen Säugetiere.

Bei den Vögeln läßt sich ebenfalls die Beobachtung machen, daß das Oxydationsvermögen der Muskeln in einer gewissen Beziehung zu ihrer Farbe steht. Die roten Muskeln der Taube weisen ein sehr hohes Oxydationsvermögen auf, während die blassen Muskeln des Brustbeins vom Huhn ein viel geringeres Oxydationsvermögen besitzen; die etwas stärker gefärbten Muskeln der hinteren Extremitäten des Huhnes haben ein mittleres Oxydationsvermögen. Dieser Unterschied im Oxydationsvermögen der blassen und roten Muskeln der Vögel läßt sich mit dem Unterschiede zwischen den blassen Muskeln des Kaninchens und des Kalbes und den roten Muskeln der anderen Säugetiere in Zusammenhang bringen. Vernon[2]) hat bei den Vögeln einen Parallelismus zwischen der Aktivität der Muskeln und ihrer Oxydationsenergie gegenüber dem Indophenolreagens konstatiert. So weisen die Pectoralmuskeln der gut fliegenden Vögel ein viel höheres Oxy-

[1]) Pighini, l. c.
[2]) Vernon, zweite Mitteilung.

dationsvermögen auf als die Muskeln der Schenkel, während beim Huhn und der Ente die Pectoralmuskeln negative Resultate liefern. Dieser Unterschied im Oxydationsvermögen erklärt sich einfach durch die Tatsache, daß beim Huhn und der Ente die Pectoralmuskeln blaß sind.

Vergleicht man die Oxydationsenergie der Gewebe gegenüber p-Phenylendiamin mit der gegenüber Bernsteinsäure, so kann man folgendes bemerken: In gewissen Geweben, wie z. B. die Skelettmuskeln, das Herz, die Hundeleber, die Milz, die Lunge und das Pankreas, ist die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs zur Oxydation des p-Phenylendiamins annähernd dieselbe wie zur Oxydation der Bernsteinsäure, gewöhnlich etwas größer bei der Oxydation des p-Phenylendiamins. In der Niere der verschiedenen daraufhin untersuchten Tiere, sowie in der Leber des Pferdes, des Rindes, des Hammels und des Kaninchens ist die bei der Oxydation der Bernsteinsäure aufgenommene Sauerstoffmenge größer als die zur Oxydation des p-Phenylendiamins verbrauchte. Diese Abweichung tritt namentlich in der Leber des Hammels stark hervor.

Das Gehirn weist ein umgekehrtes Verhalten auf. Hier ist die zur Oxydation des p-Phenylendiamins verbrauchte Sauerstoffmenge viel größer als die zur Oxydation der Bernsteinsäure aufgenommene. Man findet hier häufig, daß bei der Oxydation des p-Phenylendiamins 3 mal mehr Sauerstoff verbraucht wird als bei der Oxydation der Bernsteinsäure.

Wenn wir unsere Versuchsergebnisse mit denen der verschiedenen Autoren vergleichen, die die Indophenolreaktion benutzt haben, so finden wir bedeutende Abweichungen. Wir wollen hier nur die Arbeiten von Abelous und Biarnès[1]), von Spitzer[2]) und von Rosell[3]) erwähnen, die keine Zahlenwerte der Oxydationsenergie geben. Man sieht jedoch, daß diese Forscher zum Resultate gelangen, daß die Muskeln und das Gehirn ein niedrigeres Oxydationsvermögen besitzen als die Leber, die Milz usw. Dieses Resultat steht im Gegensatz zu

[1]) Abelous et Biarnès, Hiérarchie des organes au point de vue du pouvoir oxydant. Soc. de Biol. 1896, 262.

[2]) Spitzer, Die Bedeutung gewisser Nucleoproteide für die oxydative Leistung der Zelle. Arch. f. d. ges. Physiol. 67, 615, 1896.

[3]) Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Inaug.-Diss. Straßburg 1901.

den Versuchsergebnissen von Vernon, dessen Untersuchungen viel vollständiger und sorgfältiger sind als die der oben genannten Forscher. In seiner zweiten Arbeit macht Vernon die Beobachtung, daß bei den Säugetieren im allgemeinen das Herz und die Muskeln das höchste Oxydationsvermögen aufweisen, daß die Leber hingegen am schwächsten wirkt, während die Niere und das Gehirn eine Mittelstellung einnehmen. So findet Vernon, daß beim Hunde unter bestimmten Versuchsbedingungen der Zwerchfellmuskel 59 % des Indophenolreagens oxydiert, das Herz 55 %, die Niere 14 %, das Gehirn 17 % und die Leber nur 11 %.

Bei der Betrachtung der in der Tabelle I zusammengestellten Werte sehen wir, daß die Hundeleber p-Phenylendiamin ebenso energisch oxydiert wie die Muskeln und das Herz, und daß das Gehirn ein noch bedeutenderes Oxydationsvermögen aufweist. Ähnliches läßt sich auch bei den anderen Säugetieren verzeichnen.

Die sehr stark ausgesprochenen Abweichungen unserer Versuchsergebnisse von den von Vernon erzielten Resultaten lassen sich leicht durch die im Kapitel II erörterten Nachteile des Indophenolreagens erklären. Dieses Reagens kann nur dazu dienen, den Unterschied zwischen dem Oxydations- und dem Reduktionsvermögen eines gegebenen Gewebes gegenüber dem Indophenolreagens anzuzeigen, ohne das eigentliche Oxydationsvermögen anzugeben. Daraus erklärt sich, warum die Leber, die ein sehr starkes Entfärbungsvermögen besitzt, mit dem Indophenolreagens so schlechte Resultate gibt.

V. Parallelismus zwischen der Intensität der Hauptatmung und der Oxydation des p-Phenylendiamins oder der Bernsteinsäure durch ein gegebenes Gewebe.

In unserer Arbeit über die Oxydation der Bernsteinsäure hatten wir auf die interessante Tatsache aufmerksam gemacht, daß zwischen der Intensität der Hauptatmung und der Oxydation der Bernsteinsäure durch ein gegebenes Gewebe ein gewisser Parallelismus besteht. Wir hatten festgestellt[1]), daß

[1]) Battelli et Stern, L'Oxydation de l'acide succinique comme mesure du pouvoir oxydant dans la respiration principale des tissus animaux. Soc. de Biol. 69, 554, 1910.

die Oxydation der Bernsteinsäure ein leichtes Mittel ist, um die Intensität der Hauptatmung in einem Gewebe annähernd zu messen. In der Tat nehmen die Muskeln, die Leber, das Gehirn usw. der verschiedenen Tiere bei der Oxydation der Bernsteinsäure annähernd dieselbe Sauerstoffmenge auf, wie in der unter günstigen Bedingungen ausgeführten Hauptatmung.

Wir können nun sehen, daß für die meisten Gewebe auch das p-Phenylendiamin benutzt werden kann, um die Intensität der Hauptatmung zu messen.

Wir stellen hier einige Durchschnittswerte der von den sehr frischen Geweben (Hauptatmung) im Laufe einer $^1/_2$ Stunde aufgenommenen Sauerstoffmengen. Diese Durchschnittswerte entstammen einer großen Anzahl von in mehreren Arbeiten veröffentlichten Untersuchungen über die Hauptatmung der Gewebe. Die fein zerriebenen Gewebe sind in einer Sauerstoffatmosphäre bei 40° in Gegenwart von 1°/₀igem Na_2HPO_4 geschüttelt worden.

100 g	Muskeln vom Hund		verbrauchen	190	ccm	O_2
100 g	„	„ Rind	„	150	„	„
100 g	„	„ Kaninchen	„	50	„	„
100 g	weiße Muskeln vom Huhn		„	30	„	„
100 g	rote	„ „ „	„	80	„	„
100 g	Muskeln von der Taube		„	270	„	„
100 g	Leber vom	Hund	„	160	„	„
100 g	„ „	Kaninchen	„	150	„	„
100 g	Niere „	Hund	„	180	„	„
100 g	„ „	Rind	„	190	„	„
100 g	Gehirn „	Hund	„	110	„	„
100 g	Milz „	„	„	20	„	„
100 g	Lunge „	„	„	25	„	„

Wir könnten natürlich die Liste der Gewebe, an denen wir die Intensität der Hauptatmung untersucht haben, bedeutend verlängern, doch werden die hier angeführten Beispiele genügen, um zu zeigen, daß in den meisten Geweben die Werte der bei der Hauptatmung aufgenommenen Sauerstoffmengen annähernd dieselben sind, wie die zur Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins benutzten. Es genügt, die soeben angeführten Zahlen mit den in der Tabelle I zu-

sammengestellten Werten zu vergleichen. Besonders bemerkenswert ist, daß die blassen Muskeln des Kaninchens und hauptsächlich des Huhnes, die im Vergleich zu den roten Muskeln eine sehr geringe Hauptatmung aufweisen, zugleich auch das p-Phenylendiamin sowie die Bernsteinsäure nur schwach oxydieren.

Eine Ausnahme bildet das Gehirn in bezug auf das Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin. Die Sauerstoffaufnahme, die man bei der Hauptatmung des Hundegehirns verzeichnet, hat ungefähr denselben Wert, wie die zur Oxydation der Bernsteinsäure verbrauchte, während sie bei der Oxydation des p-Phenylendiamins viel höhere Werte erreicht.

Zwischen der Intensität der akzessorischen Atmung eines gegebenen Gewebes und dem Oxydationsvermögen desselben gegenüber p-Phenylendiamin oder Bernsteinsäure besteht nicht die geringste Beziehung. Es genügt, daran zu erinnern, daß die Muskeln und das Gehirn fast gar keine akzessorische Atmung besitzen.

VI. Gleichzeitige Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure durch die Gewebe.

Wir haben eine Reihe von Versuchen angestellt, um die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure in den Fällen zu untersuchen, wenn die beiden Substanzen gleichzeitig dem Gewebe zugesetzt werden. Die Versuche sind am Muskel, an der Leber und am Gehirn ausgeführt worden. Die Muskeln wurden vorher sorgfältig ausgewaschen, während die Leber und das Gehirn ohne jede Vorbehandlung zur Verwendung kamen.

In der folgenden Tabelle stellen wir die Resultate einiger typischer Versuche zusammen. Wir geben hier außer den Werten der Sauerstoffaufnahme auch die auf colorimetrischem Wege bestimmten Werte des oxydierten p-Phenylendiamins wieder. Zu bemerken ist hier, daß die sich auf das Gehirn und die Muskeln beziehenden colorimetrischen Werte ziemlich genau den Mengen des oxydierten p-Phenylendiamins entsprechen, da in den oben genannten Geweben die das Oxydationsprodukt entfärbenden Substanzen in geringer Menge vorhanden sind In der Leber hingegen sind diese entfärbenden Substanzen

sehr stark vertreten, so daß die auf colorimetrischem Wege erzielten Werte nur qualitativer Art sind; wir legen ihnen keine quantitative Bedeutung bei.

Tabelle II.

Gleichzeitige Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure. Die Dauer des Schüttelns betrug 30 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 39°. Jede Flasche enthielt 20 g Gewebe, 100 ccm Wasser und war mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	p-Phenylendiamin g	Bernsteinsaures Na g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Oxydiertes Phenylendiamin mg
Muskel vom Rind	1	00	46	0,30
" " "	00	2	39	—
" " "	0,20	2	41	0,04
" " "	0,50	2	44	0,14
" " "	1	2	48	0,19
Leber vom Hammel	1	00	29	0,12 (?)
" " "	00	2	37	—
" " "	0,20	2	40	0,01 (?)
" " "	0,50	2	43	0,02 (?)
" " "	1	2	45	0,06 (?)
Gehirn vom Hammel	1	00	54	0,35
" " "	C0	2	19	—
" " "	0,20	2	35	0,11
" " "	0,50	2	59	0,26
" " "	1	2	71	0,33

Aus den in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnissen ersieht man, daß die verschiedenen Gewebe ein verschiedenes Verhalten aufweisen.

Im Muskelgewebe wird die in Gegenwart von 1 g p-Phenylendiamin aufgenommene Sauerstoffmenge durch Zusatz von Bernsteinsäure nicht gesteigert. Der aufgenommene Sauerstoff verteilt sich auf die Oxydation der Bernsteinsäure und auf die Oxydation des p-Phenylendiamins.

Unserer Ansicht nach scheint dieses Resultat auf zweierlei Art gedeutet werden zu können.

Man kann erstens annehmen, daß die Oxydation des p-Phenylendiamins und die der Bernsteinsäure durch einen und denselben Katalysator verursacht werden, der in einer gegebenen Zeit nur eine bestimmte Menge Sauerstoff aktivieren könnte. Die Menge des zur Oxydation der beiden Substanzen ver-

brauchten Sauerstoffs wird natürlich je nach den Versuchsbedingungen (Temperatur, Konzentration des Substrats, Sauerstoffspannung usw.) eine verschiedene sein.

Man könnte aber auch annehmen, daß es sich hier um zwei verschiedene Katalysatoren handele. Die Menge des Sauerstoffs, der mit den im Innern der Zellen eingeschlossenen Katalysatoren in Berührung kommt, könnte ein bestimmtes maximales Maß in einer gegebenen Zeit nicht überschreiten. Sobald diese obere Grenze erreicht ist, kann durch Zusatz einer anderen oxydablen Substanz die Sauerstoffaufnahme nicht mehr gesteigert werden. Es würden also in dem Falle die physikalisch-chemischen Bedingungen viel mehr als die Oxydationsenergie der in Frage kommenden Katalysatoren das Ausschlaggebende für die maximale Sauerstoffaufnahme bilden. Dies könnte auch der Grund sein, warum die Sauerstoffaufnahme des Muskels bei der Hauptatmung, der Oxydation der Bernsteinsäure sowie der Oxydation des p-Phenylendiamins annähernd dieselben Werte aufweist. Diese Annahme erklärt aber nicht, warum der Zutritt des Sauerstoffs zum Katalysator in den blassen Muskeln immer viel langsamer erfolgen sollte als in den roten Muskeln.

Dieselbe Annahme läßt sich auch auf die Leber beziehen. Die Menge des bei der gleichzeitigen Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure aufgenommenen Sauerstoffs übersteigt nur um ein geringes die zur Oxydation der Bernsteinsäure allein verbrauchte. Auch hier scheinen sich die beiden Oxydationen nicht zu summieren.

Im Gehirn sind die Sauerstoffmengen, die bei der Oxydation des p-Phenylendiamins verbraucht werden, sehr verschieden von den zur Bernsteinsäureoxydation aufgenommenen. Andererseits stellt die bei der gleichzeitigen Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure aufgenommene Sauerstoffmenge annähernd die Summe der Sauerstoffmengen dar, die bei der getrennten Oxydation des p-Phenylendiamins sowie der Bernsteinsäure verbraucht werden. Dieses Resultat scheint für die Existenz zweier Katalysatoren im Gehirn zu sprechen, deren einer das p-Phenylendiamin oxydiert, während der andere die Oxydation der Bernsteinsäure bewirkt. Auch im Blute begegnen wir Substanzen, unter denen hauptsächlich das Hämoglobin zu nennen ist, die bei der Oxydation des p-Phenylen-

diamins wie Katalysatoren wirken, hingegen aber nicht die Fähigkeit besitzen, Bernsteinsäure zu oxydieren.

Da die Oxydation der Bernsteinsäure im Gehirn viel weniger intensiv ist als die Oxydation des p-Phenylendiamins, haben wir zu entscheiden versucht, ob die relativ geringe Oxydationsenergie des Gehirns gegenüber der Bernsteinsäure sich durch das Vorhandensein hemmender Substanzen erklären ließe. Wir haben aber solche hemmende Substanzen nicht nachweisen können. So entspricht die Menge der durch ein Gemenge von 15 g Gehirn und 15 g Muskel oxydierten Säure der Summe der durch beide Gewebe getrennt oxydierten Bernsteinsäuremengen.

Die soeben besprochenen Resultate lassen die Schlußfolgerung zu, daß im Gehirn die Oxydation der Bernsteinsäure und die Oxydation des p-Phenylendiamins durch zwei verschiedene Katalysatoren bedingt sind. Für den Muskel und die Leber bleibt es unentschieden, ob die Oxydation dieser beiden Substanzen durch einen einzigen oder durch zwei verschiedene Katalysatoren bewirkt wird.

VII. Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Blut der verschiedenen Tiere. Hemmende Wirkung des Leberauszuges.

Ehrlich[1]) hatte die Beobachtung gemacht, daß nach Injektion von Phenylendiamin und α-Naphthol das Blut keine Indophenolbildung aufweist. Vernon macht in seiner Arbeit darauf aufmerksam, daß das Blut die Indophenolreaktion nicht aufweist. Doch haben die mikrochemischen Untersuchungen mehrerer Forscher gezeigt, daß die Leukocyten, und namentlich die Mononuclearen und Polynuclearen eine positive Indophenolreaktion geben, während man mit den nicht mehr jungen Erythrocyten und den Lymphocyten nur negative Resultate erzielt. Übrigens hatten bereits zahlreiche Forscher wie Klebs, Struve, Vitali, Brücke, Achalme, Brandenburg u. a. beobachtet, daß die Leukocyten die Fähigkeit besitzen, Guajactinktur direkt zu bläuen (vgl. die Bibliographie in unserer Arbeit über die Oxydationsfermente).

Wir haben gefunden, daß das Blut in ganz deutlicher Weise p-Phenylendiamin oxydiert. Diese Oxydation scheint in

[1]) Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885.

der Mehrzahl der Fälle der Wirkung des Hämoglobins zuzuschreiben zu sein. In der Tat bemerkt man, daß bei gleich großem Hämoglobingehalt das krystallisierte Hämoglobin und das auf 58° erhitzte Pferdeblut häufig annähernd dieselbe Oxydationsintensität gegenüber p-Phenylendiamin aufweisen. v. Stoecklin[1]) hat auch beobachtet, daß das Hämoglobin die Fähigkeit hat, wie eine Oxydase zu reagieren, indem es z. B. Pyrogallol oxydiert.

Da die Leukocyten eine positive Guajacreaktion geben, oxydieren sie auch das p-Phenylendiamin. Aber diese Oxydationswirkung der Leukocyten stellt nur einen geringen Teil der totalen Oxydationswirkung des Blutes vor, in Hinsicht auf die kleine Zahl der weißen Blutkörperchen im Vergleich zu der der roten.

Das Blutserum oxydiert nicht oder fast nicht das p-Phenylendiamin. Die gewaschenen Blutkörperchen oxydieren ungefähr mit derselben Energie wie das gesamte Blut. Es scheint demnach, daß das Oxydationsvermögen in den geformten Blutelementen enthalten sei.

Bei mehreren Tierarten steigt das Oxydationsvermögen des Blutes oder der gewaschenen Blutkörperchen bedeutend an, wenn das Blut vorher 10 Minuten lang auf 58° bis 60° erhitzt wird. Eine beträchtliche Steigerung des Oxydationsvermögens erzielt man auch, wenn man das Blut der Wirkung der Pankreasfermente aussetzt. Zu 30 ccm Blut fügt man 70 ccm Wasser, Natriumcarbonat in einer Gesamtkonzentration von 2 : 1000 und 0,50 Pankreatin Merck hinzu und schüttelt das Ganze 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 38° bis 40°. Darauf fügt man das p-Phenylendiamin hinzu und verfährt wie gewöhnlich.

Es ist wahrscheinlich, daß die geformten Elemente des Blutes eine oder mehrere Substanzen enthalten, die die Oxydation des p-Phenylendiamins durch den Blutfarbstoff vermindern. Diese Substanzen scheinen wenigstens zum Teil durch Erhitzen auf 58° bis 60° oder durch die Wirkung des Pankreatins zerstört zu sein. Diese Voraussetzung läßt sich auch durch die Tatsache stützen, daß der wässerige Leberauszug,

---

[1]) de Stoecklin, Sur les propriétés oxydasiques de l'oxyhémoglobine. Compt. rend. 152, 1516, 1911.

der, wie wir später sehen werden, die Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Blut energisch hemmt, diese hemmende Wirkung nach Erhitzen auf 60° größtenteils verliert.

Die für das Blut erzielten Resultate sind häufig unbeständig. Das Blut einer gegebenen Tierart zeigt manchmal ein ziemlich hohes Oxydationsvermögen sowohl, wenn es in frischem Zustande zur Verwendung kommt als auch nach vorherigem Erhitzen auf 58° bis 60°, was sich durch einen Mangel an hemmenden Substanzen erklären ließe. In anderen Fällen hingegen weist das frische Blut ein sehr schwaches Oxydationsvermögen auf, und auch das Erhitzen auf 60° steigert die Oxydationswirkung nur wenig.

In der folgenden Tabelle sind die Resultate einiger typischer Versuche zusammengestellt, wo man das Blut in frischem Zustande oder nach vorherigem Erhitzen auf 60° benutzt hatte. Das Blut aller daraufhin untersuchten Tiere ist durch Schlagen defibriniert worden. Es wurde vorerst an der Luft energisch geschüttelt, um es vollkommen mit Sauerstoff zu sättigen. Darauf wurde die nötige Menge Wasser bis zu

Tabelle III.

Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Blut der verschiedenen Tiere. Die Dauer des Schüttelns betrug 30 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthielt 120 ccm Flüssigkeit, 1 g Phenylendiamin und war mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Tierart	Frisches Blut ccm	Erhitztes Blut ccm	Wasser ccm	Aufgenommener Sauerstoff ccm
Rind	15	—	105	11
„	50	—	70	14
„	—	15	105	12
„	—	50	70	16
Hammel . . .	15	—	105	20
„ . . .	50	—	70	29
„ . . .	—	15	105	24
„ . . .	—	50	70	34
Pferd	15	—	105	9
„	50	—	70	13
„	—	15	105	21
„	—	50	70	29
Ente	15	—	105	18
„	50	—	70	28
„	—	15	105	19
„	—	50	70	30

einem Gesamtvolumen von 120 ccm und 1 g p-Phenylendiamin hinzugefügt und im Thermostaten wie gewöhnlich energisch geschüttelt.

Die in der Tabelle III angeführten Versuchstypen zeigen, daß das Blut der verschiedenen Tiere sich nicht gleich verhält.

Das frische Blut des Rindes besitzt ein schwaches Oxydationsvermögen, das durch vorheriges Erwärmen auf 60° nur unbedeutend gesteigert wird.

Das Blut des Hammels besitzt bereits in frischem Zustande ein recht bedeutendes Oxydationsvermögen, das durch vorheriges Erwärmes auf 60° noch gesteigert wird. Das Blut des Hundes weist dasselbe Verhalten auf.

Das Blut des Pferdes besitzt in frischem Zustande ein sehr geringes Oxydationsvermögen. Durch Erhitzen auf 58° wird die Oxydationswirkung bedeutend gesteigert. Das Blut des Kaninchens zeigt dasselbe Verhalten wie das Blut des Pferdes.

Das frische Blut der Ente weist ein beträchtliches Oxydationsvermögen auf, das durch vorheriges Erhitzen auf 60° nicht merklich gesteigert wird. Das Blut des Huhnes zeigt dasselbe Verhalten.

Wie wir bereits erwähnt haben, erzielt man in der Mehrzahl der Fälle die hier angeführten Resultate, doch sind die Ausnahmen durchaus nicht selten. So zeigt z. B. das Blut des Rindes in einzelnen höchst seltenen Fällen dasselbe Verhalten wie das Blut des Hammels, und umgekehrt verhält sich manchmal das Blut des Hammels wie das Blut des Rindes.

Man ersieht außerdem aus den Versuchsergebnissen der Tabelle III, daß die Oxydation des p-Phenylendiamins durch eine 3fache Vergrößerung der angewandten Blutmenge nicht sehr stark gesteigert wird. Man beobachtet sogar in einigen Fällen, daß die Oxydation des p-Phenylendiamins keine Veränderung erfährt, wie groß auch die Menge des benutzten Blutes sei. So oxydieren z. B. 5, 15, 40 oder 80 ccm Blut gleiche Mengen p-Phenylendiamin.

Wir haben auch Versuche angestellt, um zu entscheiden, ob das Hämatin oder das auf höhere Temperaturen erhitzte Blut p-Phenylendiamin zu oxydieren vermögen.

Hämatin. Das Hämatin wird durch Behandeln des

Blutes mit HCl und Zentrifugieren der Flüssigkeit dargestellt. Der nach Entfernung des flüssigen Teiles zurückbleibende Bodensatz des Hämatins vermag p-Phenylendiamin zu oxydieren, doch ist diese Oxydationswirkung 4 bis 5 mal niedriger als die Oxydationswirkung des unveränderten Blutes.

Erhitztes Blut. Das 5fach verdünnte auf Siedetemperatur erhitzte Blut bewahrt zum Teil die Fähigkeit, das p-Phenylendiamin zu oxydieren. Diese Oxydationswirkung stellt den dritten oder vierten Teil des ursprünglichen Oxydationsvermögens des Blutes vor.

Wie wir bereits in einer früheren Arbeit gezeigt haben, hat das Blut der Säugetiere keine oxydierende Wirkung auf Bernsteinsäure. Das Blut des Huhnes oder der Ente hat ebenfalls vielleicht keine oder eine kaum in Betracht kommende Oxydationswirkung auf Bernsteinsäure.

Hemmende Wirkung der Leber. Wir haben soeben mitgeteilt, daß die geformten Elemente des Blutes wahrscheinlich Substanzen enthalten, die die Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Blut herabsetzen. Wir haben untersucht, ob diese hemmenden Substanzen auch in den Geweben vorkommen und haben gefunden, daß der wässerige Auszug der Muskeln oder des Gehirns eine kaum merkliche hemmende Wirkung besitzen, während hingegen der wässerige Auszug der Leber die Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Blut sehr energisch hemmt. Es genügt, zu 20 ccm Hammelblut 20 ccm Leberauszug (durch Hinzufügen von 3 Volumen Wasser zum zerriebenen Lebergewebe bereitet) hinzuzusetzen, um die Oxydationsenergie des Blutes auf $^1/_3$ herabzudrücken.

Der wässerige Auszug der Leber bleibt aber ohne merklichen Einfluß auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Muskeln oder das Gehirn.

VIII. Oxydationsvermögen einiger Körperflüssigkeiten: Speichel, Milch, Galle, Harn. Eier.

Das Oxydationsvermögen des Speichels gegenüber den Polyphenoloxydasereagenzien ist bereits von Schönbein, Struve, Gad und Wurster u. a. (siehe die Bibliographie in unserer Arbeit über die Oxydationsfermente) beobachtet worden. Doch gibt es bis jetzt keine quantitativen Untersuchungen.

Der Speichel oxydiert natürlich auch das p-Phenylendiamin, aber diese Oxydation ist äußerst gering im Vergleich zur Oxydationswirkung der Gewebe. So erzielt man z. B. für 100 ccm menschlichen Speichel in Gegenwart von 1 g p-Phenylendiamin bei unserer gewöhnlichen Versuchsanordnung (Schütteln in reinem Sauerstoff bei 40°) eine Sauerstoffaufnahme von 3 bis 4 ccm in 1 Stunde. Das Reaktionsgemisch weist eine recht ausgesprochene dunkle Färbung auf, die aber nach Zusatz von Alkali bedeutend schwächer wird.

Die Milch übt auf die Polyphenoloxydasereagenzien keine oxydierende Wirkung aus, wie es bereits u. a. auch von Dupouy bemerkt worden ist. Wir haben ebenfalls gefunden, daß Milch die Oxydation des p-Phenylendiamins nicht beschleunigt.

Desgleichen haben auch die Galle und der Harn keine merkliche Oxydationswirkung auf p-Phenylendiamin.

Das Eiweiß und das Eigelb des Hühnereies haben ebenfalls kein Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin.

IX. Experimentelle Ergebnisse.

Die Betrachtungen allgemeiner Natur, die man aus den in dieser Arbeit mitgeteilten Untersuchungen ableiten kann, werden wir in der folgenden Mitteilung über die Oxydation des p-Phenylendiamins erörtern. Hier wollen wir nur die experimentellen Ergebnisse zusammenfassen.

1. In einer großen Anzahl von Untersuchungen über die Oxydationsfähigkeit der Gewebe bietet die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe große Vorteile gegenüber der Indophenolreaktion.

2. Alle Gewebe der höheren Tiere besitzen die Fähigkeit, das p-Phenylendiamin unter Aufnahme molekularen Sauerstoffs zu oxydieren.

3. In der akzessorischen Atmung summiert sich die durch diese Oxydation bewirkte Sauerstoffaufnahme mit dem eigentlichen Sauerstoffverbrauch des Gewebes. In der Hauptatmung hingegen bemerkt man eine teilweise Vertretung. Der zu der gewöhnlichen eigentlichen Atmung der Gewebe bestimmte Sauerstoff wird zum Teil zur Oxydation des p-Phenylendiamins verbraucht.

4. Im allgemeinen ist die Oxydation des p-Phenylendiamins namentlich im Gehirn, im Herzen, in den roten Muskeln, in der Niere und der Leber sehr intensiv. Das Pankreas und hauptsächlich die Milz und die Lunge besitzen ein viel schwächeres Oxydationsvermögen.

Die weiße Gehirnsubstanz oxydiert das p-Phenylendiamin weniger energisch als die graue Rindensubstanz.

Die blassen Muskeln besitzen ein viel schwächeres Oxydationsvermögen als die roten Muskeln.

5. Die Tiergewebe bewahren längere Zeit nach dem Tode des Tieres die Fähigkeit, das p-Phenylendiamin zu oxydieren. Nur das Pankreas bildet hiervon eine Ausnahme.

6. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nehmen die meisten Gewebe bei der Oxydation des p-Phenylendiamins annähernd dieselbe Menge Sauerstoff auf, wie bei der Oxydation der Bernsteinsäure.

Im Gehirn hingegen ist die bei der Oxydation des p-Phenylendiamins verbrauchte Sauerstoffmenge viel größer als die zur Oxydation der Bernsteinsäure aufgenommene.

7. In den Muskeln und der Leber erfährt die Menge des zur Oxydation des p-Phenylendiamins oder der Bernsteinsäure verbrauchten Sauerstoffs keine Steigerung, wenn man diese beiden Substanzen gleichzeitig dem Gewebe zusetzt. Der aufgenommene Sauerstoff verteilt sich auf die Oxydation des p-Phenylendiamins und die Oxydation der Bernsteinsäure.

Im Gehirn hingegen stellt die zur gleichzeitigen Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure verbrauchte Sauerstoffmenge ungefähr die Summe der Sauerstoffmengen dar, die bei der getrennten Oxydation jeder dieser Substanzen aufgenommen werden.

8. Das Blut oxydiert das p-Phenylendiamin recht energisch. Diese Oxydation scheint zum größten Teil der Wirkung des Hämoglobins zuzuschreiben zu sein.

Das Blutserum übt fast keine oxydierende Wirkung aus.

Bei einigen Tierarten oxydiert das Blut oder die gewaschenen roten Blutkörperchen nach vorherigem Erwärmen auf 60° oder nach einer vorherigen Einwirkung von Pankreatin viel energischer als das frische Blut.

Das auf Siedetemperatur erhitzte oder mit Mineralsäuren

behandelte Blut verliert nicht vollständig die Fähigkeit, p-Phenylendiamin zu oxydieren.

Der wässerige Auszug der Leber hemmt energisch das Oxydationsvermögen des Blutes gegenüber p-Phenylendiamin. Diese hemmende Wirkung wird durch Erwärmen auf 60° vernichtet.

Das Blut oxydiert Bernsteinsäure nicht merklich.

9. Der Speichel besitzt ein recht schwaches Oxydationsvermögen. Die Milch, die Galle, der Harn, das Eiereiweiß sowie das Eigelb haben keine merkliche Oxydationswirkung.

10. Die Menge des bei der Hauptatmung mehrerer Gewebe aufgenommenen Sauerstoffs ist annähernd dieselbe wie die bei der Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins verbrauchte. Im Gehirn ist die zur Oxydation verbrauchte Sauerstoffmenge viel größer als die bei der Hauptatmung aufgenommene.

Einfluß verschiedener Faktoren auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1912.)

Mit Hilfe der von uns in der vorangegangenen Mitteilung beschriebenen Methode haben wir den Einfluß einer gewissen Anzahl von Faktoren auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe untersucht.

I. Einfluß der Reaktion des Mediums.

Der Einfluß der Reaktion des Mediums auf die Oxydationsgeschwindigkeit des p-Phenylendiamins durch die Gewebe ist in Anbetracht der Alkalinität der Substanz selbst schwer zu untersuchen. Nach Zusatz von Säure entsteht ein Phenylendiaminsalz, anderseits bewirkt Zusatz von Alkali eine mehr oder minder große Steigerung der spontanen Oxydation des p-Phenylendiamins, die natürlich in Betracht gezogen werden muß. Aber auch die Gegenwart des Gewebes, das die freien OH-Ionen binden kann, muß eine Änderung in der spontanen Oxydation des p-Phenylendiamins bewirken können.

Diese Verwickeltheit des Problems veranlaßte uns, auf eine eingehende Untersuchung vom physikalisch-chemischen Standpunkte aus zu verzichten. Wir haben uns darauf beschränkt, die experimentellen Ergebnisse zu verzeichnen, die man bei unserer Versuchsanordnung durch Zusatz verschiedener Mengen Säure oder Alkali erzielt.

In der Tabelle I sind zwei typische Versuchsreihen wiedergegeben. Bei der Berechnung der Säure- oder Alkalikonzentration wurde das Gewebe gleich dem gleichen Volumen Wasser berechnet.

Die Versuchstypen der Tabelle I zeigen, daß die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe stattfindet, wenn die dem Gewebe zugefügte Flüssigkeit aus gewöhnlichem Wasser besteht, oder auch in Gegenwart von geringen Mengen HCl

oder NaOH. Sobald die Konzentration dieser Substanzen etwas größer wird, sinkt die Oxydation des p-Phenylendiamins. In einer Konzentration von 1 : 2500 wirkt NaOH schädigender als HCl. Bei genügender Konzentration, z. B. 1 oder 2 : 1000, sinkt die Oxydation des p-Phenylendiamins auf ein Minimum herab.

Tabelle I.

Einfluß der Alkalien und Säuren auf die Oxydation des p-Phenylendiamins (ausgedrückt durch die Steigerung der Sauerstoffaufnahme) durch die Gewebe. Die Dauer des Schüttelns betrug 30 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Die Flaschen sind mit reinem Sauerstoff gefüllt. Jede Flasche enthält außer dem Gewebe 100 ccm Flüssigkeit und 1 g p-Phenylendiamin.

Gewebe	Alkalien oder Säuren	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Muskelrückstand vom Rind (20 g)	Wasser	41
do.	NaOH 1 : 5000	40
do.	NaOH 1 : 2500	18
do.	NaOH 1 : 1000	3
do.	HCl 1 : 5000	37
do.	HCl 1 : 2500	34
do.	HCl 1 : 1000	9
do.	HCl 2 : 1000	1
Leber vom Hammel (20 g)	Wasser	34
do.	NaOH 1 : 5000	31
do.	NaOH 1 : 2500	24
do.	NaOH 1 : 1000	18
do.	HCl 1 : 5000	35
do.	HCl 1 : 2500	33
do.	HCl 1 : 1000	14
do.	HCl 2 : 1000	5

Der vorher ausgewaschene Muskel (Muskelrückstand) zeigt sich gegen die Wirkung der Säuren und Alkalien empfindlicher, weil durch das Auswaschen lösliche Substanzen entfernt worden sind, die eine gewisse Menge H- oder OH-Ionen binden konnten.

II. Einfluß der Temperatur.

In einer Reihe von Versuchen wurde der Einfluß der Temperatur auf die Intensität der Oxydation des p-Phenylendiamins untersucht. Die Gewebesuspension wurde zuerst auf die gewünschte Temperatur erwärmt, nachdem die das Reaktionsgemisch enthaltende Flasche mit reinem Sauerstoff gefüllt worden war; darauf wurde die nötige Menge

p-Phenylendiamin hinzugesetzt und dann erst mit dem Schütteln begonnen. In der folgenden Tabelle sind zwei typische Versuchsreihen wiedergegeben.

Tabelle II.

Einfluß der Temperatur auf die Intensität der Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Gewebe. Die Dauer des Schüttelns betrug 30 Minuten. Jede Flasche enthält 20 g Gewebe, 100 ccm Wasser, NaCl 5 : 1000 und 1 g p-Phenylendiamin.

Gewebe	Temperatur Centigrad	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Muskelrückstand vom Rind	20	24
do.	30	40
do.	40	43
do.	50	39
do.	55	22
Leber vom Hammel	20	16
do.	30	27
do.	40	31
do.	50	29
do.	55	13

Aus den in der Tabelle II angeführten Versuchsergebnissen ersieht man, daß in der Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe kein ausgesprochenes Temperaturoptimum zu verzeichnen ist. Die Oxydationsintensität ist bei 30°, 40° und 50° ungefähr gleich groß, allerdings etwas bedeutender bei 40°. Bei 20° und bei 55° ist die Oxydationsintensität merklich niedriger.

Die fein zerriebenen Tiergewebe verlieren nach einem 10 Minuten langen Erwärmen auf 60° fast vollständig die Fähigkeit, p-Phenylendiamin zu oxydieren. Nach Erwärmen auf 55° ist das Oxydationsvermögen stark vermindert. Setzt man das Erwärmen $^1/_2$ Stunde lang fort, so wird das Oxydationsvermögen fast völlig vernichtet. Die geringe Oxydationswirkung, die nach Erhitzen der Gewebe auf 60° konstatiert wird, kann den kleinen Blutmengen zugeschrieben werden, die in den Geweben enthalten sind.

Der im Gehirn enthaltene Katalysator der Bernsteinsäureoxydation weist der Temperatur gegenüber einen größeren Widerstand auf, als der Katalysator der p-Phenylendiamin-

oxydation. So erfährt eine auf 55° 20 Minuten lang erhitzte Gehirnsuspension keinerlei Verminderung des Oxydationsvermögens gegenüber Bernsteinsäure, während die Oxydation des p-Phenylendiamins stark herabgesetzt ist, wie wir es soeben gesagt haben.

Vernon hatte in seinen Indophenolversuchen die Beobachtung gemacht, daß das Temperaturoptimum von der Konzentration des Substrats beeinflußt wird. Ist diese Konzentration eine etwas stärkere, so nimmt die Indophenolbildung mit steigender Temperatur von 2° bis 9° zu und nimmt bei weiterer Temperatursteigerung wieder ab. Für schwächere Konzentrationen liegt das Temperaturoptimum bei 23° bis 30°.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß die abweichenden Resultate Vernons zum Teil darauf beruhen, daß die Oxydation des p-Phenylendiamins das Übergewicht erlangt, zum Teil auch auf der Giftwirkung des α-Naphthols.

Vernon hatte gefunden, daß der die Indophenolbildung bewirkende Katalysator durch Erhitzen auf 60° zerstört wird, und daß Erwärmen auf 55° während $^1/_2$ Stunde dieselbe Wirkung hat. Wie zu erwarten war, erzielt man das gleiche Resultat in bezug auf das Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin.

Vergleicht man den Einfluß der Temperatur auf den Katalysator der Bernsteinsäureoxydation mit dem auf den Katalysator der p-Phenylendiaminoxydation, so macht man folgende Bemerkung. Der Einfluß der Temperatur auf die Bernsteinsäureoxydation ist viel stärker ausgesprochen als bei der Oxydation des p-Phenylendiamins. Das Temperaturoptimum bei 40° ist ebenfalls viel deutlicher. Allerdings genügt dieser Unterschied im Verhalten der Katalysatoren gegenüber der Temperatur nicht, um daraus auf eine Verschiedenheit der Katalysatoren zu schließen, denn dieser Unterschied kann von der Abhängigkeit der Oxydabilität des Substrats von der Temperatur herrühren.

Was den Widerstand der Gewebe gegen vorheriges Erwärmen auf 55° oder 60° betrifft, so zeigt das Oxydationsvermögen gegenüber Bernsteinsäure dasselbe Verhalten wie die Oxydationsfähigkeit gegenüber p-Phenylendiamin, mit Ausnahme des Gehirns, wie wir es eben erwähnt haben.

III. Einfluß der Salzkonzentration.

In den Versuchen betreffend den Einfluß der Salzkonzentration haben wir das NaCl und das Na_2SO_4, $10\,H_2O$ verwandt. Die benutzten Gewebe waren die Muskeln des Rindes sowie die Leber und das Gehirn des Hammels.

In der Tabelle III stellen wir einige typische Versuche zusammen. Bei der Berechnung der Salzkonzentration wurde nur die Flüssigkeitsmenge in Betracht gezogen. Das Gewebe wurde vernachlässigt, weil es eine isotonische Salzkonzentration aufweist.

Tabelle III.

Einfluß des NaCl in verschiedenen Konzentrationen auf die Intensität der Phenyldiaminoxydation durch die Gewebe. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 20 g Gewebe, 100 ccm Wasser, 1 g Phenylendiamin und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Die NaCl-Konzentration bezieht sich nur auf das hinzugefügte Wasser.

Gewebe	NaCl-Konzentration %	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Leber vom Hammel	0,00	27
do.	0,30	36
do.	0,60	35
do.	1,00	29
do.	2,00	16
do.	4,00	8
Muskelrückstand vom Rind	0,00	24
do.	0,30	35
do.	0,60	34
do.	1,00	25
do.	2,00	17
do.	4,00	6
Gehirn vom Hammel	0,00	30
do.	0,30	39
do.	0,60	41
do.	1,00	44
do.	2,00	32
do.	4,00	13

Aus den hier zusammengestellten Versuchsergebnissen ersieht man, daß in schwacher Konzentration, 0,3 oder 0,6% z. B., das Natriumchlorid eine deutliche Steigerung der Oxydationsintensität des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe bewirkt. Nur wenn die Salzkonzentration höhere Werte erreicht (2 oder 4% z. B.), beobachtet man eine bedeutende Verminderung der Phenylendiaminoxydation. Das Oxydations-

vermögen des Gehirns wird durch stärkere Salzkonzentrationen weniger beeinflußt als das der Leber und des Muskels.

Das von uns benutzte Na_2SO_4, $10 H_2O$ übt in schwächerer Konzentration (z. B. 1,6 °/₀ entsprechend einer NaCl-Konzentration von 0,3 °/₀) einen günstigen Einfluß auf die Oxydationsintensität aus. In etwas stärkerer Konzentration bewirkt dieses Salz eine bedeutendere Verminderung der p-Phenylendiaminoxydation als eine entsprechende Konzentrationen von NaCl. So bewirkt z. B. das Na_2SO_4, $10 H_2O$ in einer Konzentration von 11 °/₀, entsprechend ungefähr einer NaCl-Konzentration von 2 °/₀, eine ebenso beträchtliche Verminderung der Oxydationsintensität wie das NaCl in einer Konzentration von 4 °/₀.

IV. Einfluß der Konzentration des p-Phenylendiamins.

Die Konzentration des p-Phenylendiamins übt auf die Oxydationsgeschwindigkeit einen nicht unbedeutenden Einfluß aus, wie wir es aus den in der folgenden Tabelle IV angeführten typischen Versuchen sehen werden. In den hierhergehörigen Versuchen wurde natürlich stets eine genügende Phenylendiaminmenge hinzugesetzt, damit am Ende des Versuches ein Teil unveränderten Phenylendiamins zurückbleibe.

Bei der Berechnung der p-Phenylendiaminkonzentration wurde jedes Gramm Gewebe als gleichwertig mit 1 ccm Wasser betrachtet. So wurde in den Versuchen der Tabelle IV angenommen, daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit 120 ccm betrage.

Tabelle IV.

Einfluß der p-Phenylendiaminkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 20 g Gewebe, 100 ccm Wasser und NaCl in einer Konzentration von 0,3 °/₀ und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	p-Phenylendiaminmenge g	Konzentration des p-Phenylendiamins °/₀	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Muskelrückstand vom Rind	0,30	0,25	23
do.	0,60	0,50	37
do.	1,20	1,00	46
do.	2,40	2,00	48
Gehirn vom Hammel	0,30	0,25	27
do.	0,60	0,50	48
do.	1,20	1,00	57
do.	2,40	2,00	56

Die in dieser Tabelle angegebenen Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Gewebe mit steigender Konzentration dieser Substanz bis zu einem Maximum zunimmt. Dieses Maximum ist erreicht, sobald die Konzentration 1% beträgt. Die Oxydation erfährt durch Steigerung der Konzentration des p-Phenylendiamins bis zu 2% keine Veränderung. Noch höhere Konzentrationen haben wir nicht benutzt.

Die Leber weist ein analoges Verhalten gegenüber der p-Phenylendiaminkonzentration auf.

In der Mehrzahl der von uns untersuchten Fälle sind die Resultate analog den in der Tabelle IV angeführten; doch gibt es auch Ausnahmen, wo die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Gewebe bei einer Konzentration von 2% geringer ist als bei einer Konzentration von 1%.

V. Einfluß der Sauerstoffspannung.

Die in den vorhergehenden Kapiteln erörterten Versuche sind alle in einer Atmosphäre reinen Sauerstoffes ausgeführt. Ersetzt man den Sauerstoff durch gewöhnliche Luft, so beobachtet man eine beträchtliche Verminderung der Oxydation des p-Phenylendiamins. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß die Oxydation in einer gewöhnlichen Luftatmosphäre um ein Drittel schwächer ist als in reinem Sauerstoff.

In dieser Hinsicht verhält sich die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe wie die Hauptatmung und wie die Oxydation der Bernsteinsäure, der Citronensäure und der Harnsäure, die in reinem Sauerstoff ebenfalls viel energischer verlaufen als in gewöhnlicher Luft. Die akzessorische Atmung sowie die Oxydation des Alkohols durch die Alkoholoxydase vollziehen sich hingegen in gewöhnlicher Luft mit derselben Energie wie in reinem Sauerstoff.

VI. Versuche, den Katalysator der p-Phenylendiaminoxydation darzustellen. Wässeriger Auszug der Gewebe, gewaschener Rückstand. Acetonfällung usw.

Wir haben mehrere Versuche gemacht, um den in den Geweben enthaltenen Katalysator der p-Phenylendiaminoxydation zu isolieren.

Vernon hat im Laufe seiner Untersuchungen gefunden, daß die wässerigen Auszüge der Muskeln die Indophenolreaktion nicht aufweisen. Er schloß daraus, daß die Indophenoloxydase wahrscheinlich unlöslich sei oder, falls ein geringer Teil dieser Oxydase in Lösung geht, die Oxydationswirkung derselben mehr als hinreichend durch die reduzierenden Substanzen des Extraktes neutralisiert werde. Wir haben auch die

wässerigen Auszüge der anderen den Katalysator der p-Phenylendiaminoxydation in großer Menge enthaltenden Gewebe untersucht. Zu diesem Zwecke wurden die Gewebe (Muskeln, Leber, Gehirn) fein zerrieben, mit dem dreifachen Volumen Wasser versetzt und 3 bis 4 Stunden unter häufigem Umrühren in Kontakt gelassen. Man zentrifugiert und erhält auf diese Weise eine mehr oder minder trübe Flüssigkeit. Die klaren Auszüge haben ein sehr geringes Oxydationsvermögen. Die trüben Auszüge haben ein stärkeres Oxydationsvermögen, das aber durch Filtrieren der Flüssigkeit sehr stark vermindert wird. Setzt man zur Flüssigkeit Essigsäure in einer Gesamtkonzentration von 1 : 1000 hinzu, so erhält man ein Filtrat, das auf p-Phenylendiamin ohne jede oxydierende Wirkung bleibt.

Der in Frage kommende Katalysator ist also in Wasser unlöslich

Anderseits ist es uns nicht gelungen, den Katalysator durch Aceton- oder Alkoholbehandlung des Gewebes darzustellen. Das fein zerriebene Gewebe wurde 5 Minuten lang mit dem zweifachen Volumen Alkohol oder Aceton verrührt, durch ein Leinwandtuch stark ausgepreßt und der auf diese Weise erhaltene Rückstand im Vakuum getrocknet. Der in etwas feuchtem Zustande verwandte oder der völlig trockne Rückstand bewirkt keine oder eine kaum merkliche Oxydation des p-Phenylendiamins.

Der Katalysator der Bernsteinsäureoxydation ist ebenfalls in Wasser unlöslich und wird durch Behandeln der Gewebe mit Alkohol oder Aceton vernichtet. In dem Punkte weisen diese beiden Katalysatoren ein gleiches Verhalten auf.

Das beste Präparat bildet der Muskelrückstand. Wie wir bei der Beschreibung der Methode bereits gesagt haben, kann der Muskel wieder holt gewaschen werden, ohne daß hierdurch die Oxydation des p-Phenylendiamins beeinträchtigt wird. Man erhält eine graue, teigartige Masse, die bei niedriger Temperatur mehrere Tage hindurch ungeschwächt die Fähigkeit bewahrt, p-Phenylendiamin sowie Bernsteinsäure zu oxydieren. Die anderen Gewebe eignen sich weniger zu dieser Präparation, da sie im Wasser eine Emulsion bilden, die sich nicht gut durch ein Tuch auspressen läßt.

VII. Widerstand gegen Säuren und Alkalien.

In den hierhergehörigen Versuchen haben wir die verschiedenen Gewebe der Wirkung von Säuren und Alkalien ausgesetzt und hierauf das Oxydationsvermögen der so behandelten Gewebe gegenüber p-Phenylendiamin und Bernsteinsäure untersucht.

20 g fein zerriebenen Gewebes werden mit 70 ccm Wasser und der nötigen Menge NaOH oder HCl versetzt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Man fügt hernach etwas Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ccm hinzu und läßt das Ganze bei 18° 15 Minuten lang unter häufigem Umrühren in Kontakt. Man neutralisiert hernach, bis die Reaktion gegen Lackmuspapier leicht sauer reagiert, fügt 1 g

p-Phenylendiamin oder 2 g bernsteinsaures Natrium hinzu und verfährt im übrigen wie gewöhnlich.

In der folgenden Tabelle stellen wir die Resultate einiger typischer Versuche zusammen.

Tabelle V.

Einfluß der vorherigen Einwirkung (Kontakt von 15 Minuten) von Säuren und Alkalien auf die Katalysatoren der p-Phenylendiamin- und der Bernsteinsäureoxydation. Jede Flasche enthält 20 g Gewebe, 1 g p-Phenylendiamin oder 2 g bernsteinsaures Natrium und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 40°.

Gewebe	Vorbehandlung mit HCl oder NaOH in verschiedener Konzentration	p-Phenylendiamin oder bernsteinsaures Natrium g	Sauerstoffaufnahme ccm
Muskel vom Rind	—	p-Phenylendiamin	47
do.	—	bernsteinsaures Na	35
do.	NaOH 1 : 1000	p-Phenylendiamin	46
do.	do. 1 : 1000	bernsteinsaures Na	36
do.	do. 1,5 : 1000	p-Phenylendiamin	41
do.	do. 1,5 : 1000	bernsteinsaures Na	28
do.	do. 2 : 1000	p-Phenylendiamin	28
do.	do. 2 : 1000	bernsteinsaures Na	22
do.	HCl 0,5 : 1000	p-Phenylendiamin	35
do.	do. 0,5 : 1000	bernsteinsaures Na	28
do.	do. 0,75 : 1000	p-Phenylendiamin	27
do.	do. 0,75 : 1000	bernsteinsaures Na	22
do.	do. 1 : 1000	p-Phenylendiamin	14
do.	do. 1 : 1000	bernsteinsaures Na	11
do.	do. 2 : 1000	p-Phenylendiamin	2
do.	do. 2 : 1000	bernsteinsaures Na	0
Gehirn vom Hammel	—	p-Phenylendiamin	58
do.	—	bernsteinsaures Na	19
do.	NaOH 1 : 1000	p-Phenylendiamin	52
do.	do. 1 : 1000	bernsteinsaures Na	17
do.	do. 1,5 : 1000	p-Phenylendiamin	43
do.	do. 1,5 : 1000	bernsteinsaures Na	16
do.	do. 2 : 1000	p-Phenylendiamin	26
do.	do. 2 : 1000	bernsteinsaures Na	13
do.	HCl 0,5 : 1000	p-Phenylendiamin	39
do.	do. 0,5 : 1000	bernsteinsaures Na	15
do.	do. 1 : 1000	p-Phenylendiamin	14
do.	do. 1 : 1000	bernsteinsaures Na	8
do.	do. 1,5 : 1000	p-Phenylendiamin	1
do.	do. 1,5 : 1000	bernsteinsaures Na	0

Die in dieser Tabelle angeführten Resultate zeigen vor allen Dingen, daß HCl eine viel schädigendere Wirkung auf das Oxydationsvermögen der Gewebe gegenüber p-Phenylendiamin und Bernsteinsäure ausübt als NaOH. So bewirkt z. B.

HCl in einer Konzentration von 0,5 : 1000 eine ebenso starke Verminderung des Oxydationsvermögens wie NaOH in einer Konzentration von 1,5 : 1000.

Vorherige Einwirkung von HCl in einer Konzentration von 1,5 : 1000 vernichtet vollständig die Oxydationsfähigkeit, während unter denselben Bedingungen nach Einwirkung von NaOH in einer Konzentration von 2 : 1000 die Gewebe ein ziemlich hohes Oxydationsvermögen bewahren.

In den Muskeln ist die Herabsetzung des Oxydationsvermögens gegenüber der Bernsteinsäure parallel der Herabsetzung des Oxydationsvermögens gegenüber p-Phenylendiamin. Die Leber zeigt ein analoges Verhalten.

Im Gehirn hingegen ist die Herabsetzung der p-Phenylendiaminoxydation verhältnismäßig viel stärker als die der Bernsteinsäureoxydation.

VIII. Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Gewebe.

Vernon hat in seiner dritten Arbeit über die Indophenoloxydase den Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds auf die Indophenolbildung durch die Tiergewebe untersucht. Er findet, daß die Gewebe (Leber, Herz, Gehirn, Niere) nach Erhitzen auf 60° die Fähigkeit verlieren, Indophenol zu bilden, daß sie aber diese Fähigkeit nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd wieder erlangen. Die auf 60° oder 100° erhitzte Leber bildet nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd ungefähr die gleiche Menge Indophenol. Aus diesen Versuchen schließt Vernon, daß die Indophenoloxydase der Tiergewebe aus zwei Teilen besteht: der Oxygenase, die ein echtes Ferment ist und bei 55 bis 60° zerstört wird, und der Peroxydase, die ein Aktivator nicht enzymatischer Natur ist, da sie durch Sieden nicht vernichtet wird.

Die Versuche von Vernon können nicht als Beweis angesehen werden, daß der Katalysator der Indophenolbildung (oder der p-Phenylendiaminoxydation) in allen tierischen Geweben wirklich aus zwei Teilen besteht. Zu beachten ist vor allen Dingen, daß Vernon in den hier erörteten Versuchen die Gewebe nicht gewaschen hat und daß dieselben infolgedessen nicht ganz frei von Blut waren. Es ist aber bekannt,

daß das Hämoglobin in Gegenwart von H_2O_2 alle Peroxydasereaktionen aufweist, und zwar dank seinem Eisengehalt. Das mit H_2O_2 versetzte Blut oxydiert die verschiedenen Polyphenoloxydasereagenzien weit energischer als alle Gewebe. Das auf Siedetemperatur erhitzte Hämoglobin gibt noch positive Peroxydasereaktionen. Es liegt auf der Hand anzunehmen, daß in den Versuchen von Vernon die Indophenolbildung durch die auf 60° erhitzten Gewebe in Gegenwart von H_2O_2 dem darin enthaltenen Hämoglobin zukommt.

Wir haben die Versuche über den Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds sowohl auf die Indophenolbildung als auf die p-Phenylendiaminoxydation durch die Gewebe wieder aufgenommen. Die Gewebe wurden durch Auswaschen soweit wie möglich von dem darin enthaltenen Hämoglobin und anderen Eisenverbindungen befreit. Der Muskel eignet sich besonders gut zu diesen Untersuchungen, da er unzähligemal gewaschen werden kann, ohne sein Oxydationsvermögen einzubüßen. Man findet nun, daß die ersten, ziemlich stark rotgefärbten wässerigen Auszüge der Muskeln die Indophenolreaktion sowie die Oxydation des p-Phenylendiamins in Gegenwart von H_2O_2 energisch vollziehen. In dem Maße wie die wässerigen Auszüge blasser werden, verschwindet auch ihre Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu aktivieren und hört zuletzt ganz auf. Die Fähigkeit H_2O_2 zu aktivieren ist zum größten Teil dem in den Auszügen enthaltenen Hämoglobin zuzuschreiben. Anderseits besitzen diese Auszüge und selbst der erste (stärker gefärbte) Auszug eine ziemlich schwache Oxydationswirkung auf p-Phenylendiamin. Das Blut oxydiert nach Zusatz von H_2O_2 das p-Phenylendiamin 40 bis 50mal energischer als der wässerige Muskelauszug.

Der nicht gewaschene, auf 60° erhitzte Muskel oxydiert in Gegenwart von H_2O_2 p-Phenylendiamin recht energisch und bewirkt auch deutliche Indophenolbildung, wie es Vernon beobachtet hat. In dem Maße aber, wie der Muskel durch wiederholtes Auswaschen blasser wird, verliert er auch die Fähigkeit, nach Erhitzen auf 60° H_2O_2 zu aktivieren.

Nach einem 12 bis 20mal wiederholten Auswaschen erhält man einen recht weißen Muskelrückstand, namentlich wenn man Hundemuskel benutzt. Dieser Muskelrückstand

oxydiert sehr energisch das p-Phenylendiamin und weist auch eine sehr starke Indophenolbildung auf. Nach Erhitzen auf 60° verliert dieser Muskelrückstand natürlich das Oxydationsvermögen, und auch nach Zusatz von H_2O_2 bewirkt er keine Beschleunigung der Indophenolbildung noch der p-Phenylendiaminoxydation.

Wir können also durch wiederholtes Auswaschen des Muskels einen Muskelrückstand bereiten, der ein sehr energisches Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin oder dem Indophenolreagens besitzt, und in dem keine merklichen Peroxydasemengen nachgewiesen werden können.

Ein ähnliches Resultat erzielt man durch die Alkohol- oder Acetonbehandlung des Muskelrückstandes. Wie wir bereits gesehen haben, verlieren die Gewebe nach Alkohol- oder Acetonbehandlung die Fähigkeit, p-Phenylendiamin zu oxydieren. Behandelt man nun auf diese Weise den nicht gewaschenen oder nur wenig gewaschenen Muskel, so erhält man ein Präparat, das in Gegenwart von H_2O_2 p-Phenylendiamin energisch oxydiert; wird aber ein gut ausgewaschener Muskelrückstand mit Alkohol oder Aceton behandelt, so erhält man ein Präparat, das die Oxydation des p-Phenylendiamins durch H_2O_2 nicht zu aktivieren vermag.

Wir haben folgendes Verfahren benutzt. Der fein zerriebene Muskel wurde wiederholt mit Wasser ausgewaschen, bis ein recht weißer Rückstand erzielt wurde. Dieser Rückstand wurde mit dem 3fachen Volumen Alkohol oder Aceton versetzt, 5 Minuten lang verrührt und darauf durch ein Leinwandtuch gepreßt und im Vakuum getrocknet. Man erhält auf diese Weise ein Gewebepulver, das nur geringe Menge Katalase enthält, so daß die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds nur unbeträchtlich ist.

Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zu diesem Gewebepulver bewirkt eine kaum merkliche Oxydation des p-Phenylendiamins.

Wir sehen also, daß nach Behandeln mit Alkohol oder Aceton keine Spur einer Peroxydase im gut ausgewaschenen Muskelrückstande nachgewiesen werden kann, der hingegen im frischen Zustande p-Phenylendiamin höchst energisch oxydierte.

Es scheint uns demnach, daß die Ansicht von Vernon, wonach der Katalysator der Indophenolbildung in den Tiergeweben mit Hilfe einer Peroxydase wirkt, nicht als bewiesen betrachtet werden kann. Es ist uns nicht gelungen, diesen Katalysator in zwei Teile zu zerlegen.

IX. Einfluß des Trypsins.

In einer früheren Arbeit[1]) haben wir die Beobachtung gemacht, daß das Trypsin die Eigenschaft besitzt, sowohl die Hauptatmung als auch die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Tiergewebe zu hemmen. Die akzessorische Atmung, die Urikoxydase und die Alkoholoxydase hingegen werden nicht beeinflußt.

In den hierhergehörigen Versuchen haben wir das Pankreatin von Merck benutzt, und wir haben dessen Einwirkung auf die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure durch die Tiergewebe untersucht. Das Pankreatin Merck hemmt die Oxydation des Phenylendiamins durch die Tiergewebe 15 bis 20mal stärker als das Trypsin Grübler.

Das Pankreatin kann im Anfange des Versuchs dem Reaktionsgemisch zugesetzt werden, aber man erzielt eine weit stärkere Wirkung, wenn man das Pankreatin vorher eine Zeitlang auf das Gewebe einwirken läßt. Wir verfahren hierbei wie folgt:

Zu 20 g fein zerriebenen Gewebes fügt man 80 ccm Wasser und die gewünschte Menge Pankreatin hinzu. Alkalizusatz ist nicht notwendig für die Wirkung des Pankreatins. Man schüttelt das Ganze energisch bei 40° 15 Minuten lang und fügt sodann das p-Phenylendiamin oder das bernsteinsaure Natrium hinzu und verfährt dann wie gewöhnlich.

In der umstehenden Tabelle stellen wir die Resultate einiger typischen Versuche zusammen. Wie in den vorher beschriebenen Versuchen wurde zu dem das p-Phenylendiamin enthaltenden Reaktionsgemisch Kochsalz in einer Konzentration von 3:1000 hinzugefügt, während zum Reaktionsgemisch der Bernsteinsäure nur gewöhnliches Wasser hinzugefügt wurde.

Die mit der Leber des Hammels ausgeführten Versuche haben ähnliche Resultate geliefert.

Aus den in dieser Tabelle angeführten Resultaten ersieht man vor allen Dingen, daß das Pankreatin bereits in kleinen Dosen die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure vermindert. Mit steigender Pankreatinmenge wird die Abschwächung des Oxydationsvermögens der Gewebe eine größere.

---

[1]) Battelli und Stern, Wirkung des Trypsins auf die verschiedenen Oxydationsvorgänge in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 34, 263, 1911.

Tabelle VI.

Einfluß des Pankreatins auf die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure durch das Tiergewebe. Das Pankreatin wird vorerst 15 Minuten lang auf das Gewebe einwirken gelassen. Jede Flasche enthält 20 g Gewebe, 80 ccm Wasser und 1 g Phenylendiamin oder 2 g bernsteinsaures Na. Alle anderen Versuchsbedingungen sind dieselben wie in den vorherigen Tabellen.

Gewebe	p-Phenylendiamin 1 g oder bernsteinsaures Na 2 g	Pankreatin g	Aufgenommener Sauerstoff ccm
Muskelrückstand vom Rind	p-Phenylendiamin	0,00	48
do.	bernsteinsaures Na	0,00	43
do.	p-Phenylendiamin	0,02	37
do.	bernsteinsaures Na	0,02	17
do.	p-Phenylendiamin	0,10	28
do.	bernsteinsaures Na	0,10	7
do.	p-Phenylendiamin	0,50	19
do.	bernsteinsaures Na	0,50	4
do.	p-Phenylendiamin	1,00	18
do.	bernsteinsaures Na	1,00	2
Gehirn vom Hammel	p-Phenylendiamin	0,00	54
do.	bernsteinsaures Na	0,00	20
do.	p-Phenylendiamin	0,02	37
do.	bernsteinsaures Na	0,02	14
do.	p-Phenylendiamin	0,10	32
do.	bernsteinsaures Na	0,10	10
do.	p-Phenylendiamin	0,50	28
do.	bernsteinsaures Na	0,50	5
do.	p-Phenylendiamin	1,00	26
do.	bernsteinsaures Na	1,00	3

Das Pankreatin hemmt die Oxydation der Bernsteinsäure viel energischer als die des p-Phenylendiamins. Die Gewebe, hauptsächlich das Gehirn, bewahren in einem ziemlich hohen Grade ihr Vermögen p-Phenylendiamin zu oxydieren, selbst wenn man große Dosen Pankreatin verwendet (z. B. 1 bis 2 g Pankreatin für 20 g Gewebe) und das Gewebe vorher sehr lange (z. B. 1 Stunde) mit dem Pankreatin schüttelt. Das Oxydationsvermögen der Gewebe gegenüber der Bernsteinsäure sinkt unter diesen Umständen auf Null herab.

Wird das Pankreatin gleichzeitig mit dem p-Phenylendiamin oder der Bernsteinsäure dem Gewebe zugesetzt und wird unverzüglich mit dem Schütteln in Gegenwart von Sauerstoff begonnen, so ist die hemmende Wirkung des Pankreatins eine viel schwächere, namentlich wenn man kleine Mengen benutzt. Verwendet man etwas größere Pankreatinmengen (0,50 g

z. B.), so ist unter diesen Umständen die hemmende Wirkung anfangs nur gering, nimmt aber bald zu und erreicht nach kurzer Zeit einen ebenso hohen Wert, wie wenn die Einwirkung des Pankreatins auf das Gewebe vorher stattgefunden hätte.

Durch längeres Sieden wird die hemmende Wirkung des Pankreatins sehr stark vermindert (40 bis 50 mal).

Wir haben bereits erwähnt, daß das frische Pankreas ein recht hohes Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin und Bernsteinsäure besitzt. Nach einem Aufenthalte von 24 Stunden bei 18° ist dieses Oxydationsvermögen im Pankreas fast völlig geschwunden, während es hingegen in den anderen Geweben intakt bleibt.

Die Wirkung des Pankreatins auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Blut ist eine ganz andere als die auf das Oxydationsvermögen der Gewebe. Das dem Blute zugesetzte Pankreatin steigert die Oxydation des p-Phenylendiamins. So fanden wir z. B. in einem Versuch, daß 30 ccm Hammelblut nach Zusatz von 0,50 Pankreatin und 1 g p-Phenylendiamin 32 ccm Sauerstoff aufnahmen, während die Kontrollprobe, die kein Pankreatin enthielt, bloß 26 ccm Sauerstoff verbrauchte.

X. Einfluß des Pankreatins und der Aminosäuren auf die Polyphenoloxydasen pflanzlichen Ursprungs.

Wir haben keineswegs die Absicht, hier die pflanzlichen Oxydasen eingehend zu studieren. Wir wollen nur flüchtig einige Charaktereigentümlichkeiten erwähnen, die die echten Polyphenoloxydasen pflanzlichen Ursprungs von dem Katalysator der p-Phenylendiaminoxydation in den Tiergeweben unterscheiden. Wir geben hier bloß die experimentellen Resultate unserer Untersuchungen wieder und enthalten uns jeder theoretischen Schlußfolgerung in bezug auf die pflanzlichen Polyphenoloxydasen, weil es den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde.

Die Wirkung des Pankreatins auf die Polyphenoloxydase ist ganz verschieden von der Wirkung, die das Pankreatin auf die Oxydation des Phenylendiamins durch die Tiergewebe ausübt. Die im Pankreatin enthaltenen Substanzen beschleunigen die Oxydation der Polyphenoloxydasereagenzien.

Als Polyphenoloxydasereagenzien haben wir hauptsächlich Guajactinktur und p-Phenylendiamin benutzt. Das p-Phenylendiamin diente zu den quantitativen Bestimmungen und die Guajactinktur wurde hauptsächlich zu den qualitativen Reaktionen benutzt.

In der Mehrzahl unserer Versuche haben wir den Lactarius vellereus benutzt, der bekanntlich an Polyphenoloxydase äußerst reich ist. In einigen Versuchen haben wir auch Kartoffelschalen benutzt.

Die quantitativen Bestimmungen der Polyphenoloxydase sind in derselben Weise ausgeführt worden, wie bei der Untersuchung der p-Phenylendiaminoxydation durch die Tiergewebe. Das fein zerriebene Pflanzengewebe oder dessen Alkoholniederschlag usw. wird mit Wasser versetzt, so daß eine feine Suspension entsteht. Man fügt die nötige Menge p-Phenylendiamin hinzu und schüttelt energisch bei 40° in einer Sauerstoffatmosphäre.

Die Oxydation des p-Phenylendiamins durch Lactarius vellereus ist äußerst stark. So oxydieren z. B. 12 g Lactarius nach Zusatz von 1 g p-Phenylendiamin im Laufe von 30 Minuten ungefähr 0,50 p-Phenylendiamin, was einen Sauerstoffverbrauch von ungefähr 75 ccm ausmacht. Kein einziges der von uns untersuchten Tiergewebe weist eine solche Oxydationsenergie gegenüber p-Phenylendiamin auf. Das Oxydationsvermögen der Kartoffelschale ist p-Phenylendiamin gegenüber 8 bis 10 mal kleiner als das des Lactarius vellereus.

Um den Einfluß des Pankreatins auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Pflanzengewebe zu bestimmen, kann man auf verschiedene Art verfahren, aber es ist stets vorzuziehen, das die Oxydase enthaltende Präparat vorher mit dem Pankreatin 15 Minuten lang bei 40° zu schütteln. Man fügt sodann das p-Phenylendiamin hinzu und verfährt im übrigen wie gewöhnlich.

In diesen Versuchen kann man relativ kleine Mengen frischen Lactarius vellereus verwenden. So haben wir in einem Versuche gefunden, daß 5 g Lactarius vellereus nach Zusatz von 100 ccm Wasser und 1 g p-Phenylendiamin im Laufe einer halben Stunde 24 ccm Sauerstoff aufnahm, während derselbe nach vorherigem Schütteln mit 0,50 Pankreatin von Merck unter sonst gleichen Bedingungen 37 ccm Sauerstoff verbrauchte.

Das beste Verfahren besteht jedoch darin, das Pankreatin auf den Alkoholniederschlag des wässerigen Auszuges des Lactarius vellereus einwirken zu lassen. Der fein zerriebene Lactarius vellereus wird mit dem dreifachen Volumen Wasser versetzt und an einem kühlen Orte 24 Stunden lang unter häufigem Umrühren in Kontakt gelassen. Man filtriert durch Watte und fügt zum Filtrat ein gleiches Volumen Alkohol hinzu. Der entstandene Niederschlag kann dann ohne weiteres zu den Versuchen benutzt werden, da der zurückbleibende Alkohol die Reaktion nicht stört. Man kann aber auch das Präparat im Vakuum über Schwefelsäure trocknen.

Bei dem soeben beschriebenen Verfahren bleibt aber ein großer Teil der Oxydase in der Alkoholflüssigkeit zurück. Will man daher eine größere Ausbeute erzielen, so behandelt man den wässerigen Auszug mit Alkohol in Gegenwart von Magnesiumsulfat nach dem von Bach[1]) an-

---

[1]) Bach, Eine Methode zur schnellen Verarbeitung von Pflanzenextrakten auf Oxydationsfermente. Chem. Ber. **43**, 362, 1910. — Bach und Sbarsky, Über das Verhalten der Phenolase gegen Säuren. Diese Zeitschr. **34**, 473, 1911.

gegebenen Prinzip. Der wässerige Auszug des Lactarius vellereus wird mit $MgSO_4$ in einer Gesamtkonzentration von 2 : 100 und mit dem zweifachen Volumen Alkohol versetzt. Bei der Fällung reißt das Magnesiumsulfat große Fermentmengen mit. Im übrigen verfährt man wie bei der Alkoholfällung ohne Magnesiumsulfat.

Das durch einfache Alkoholfällung oder durch Alkohol-$MgSO_4$-Fällung bereitete Präparat weist ein recht geringes Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin auf. Durch Zusatz von Pankreatin wird dieses Oxydationsvermögen sehr bedeutend gesteigert.

Wir wollen hier als Beispiel einen Versuch anführen, den wir sehr oft mit dem gleichen Resultate wiederholt haben. In eine Flasche wird 1 g zwischen Filtrierpapier ausgepreßten Alkoholniederschlags, 100 ccm Wasser sowie 0,50 Pankreatin Merck hineingebracht und das Ganze 15 Minuten lang bei 40° energisch geschüttelt. Darauf setzt man 1 g p-Phenylendiamin hinzu und schüttelt 30 Minuten lang in einer Sauerstoffatmosphäre. Eine andere zur Kontrolle dienende Flasche enthält kein Pankreatin. Man erzielt hierbei folgendes Resultat:

1 g Alkoholniederschlag ohne Pankreatin verbraucht 3 ccm O_2.
1 g " mit 0,50 " " 29 " O_2.

Der durch Alkoholfällung in Gegenwart von Magnesiumsulfat dargestellte Niederschlag weist genau dasselbe Verhalten auf.

Wird das Pankreatin gleichzeitig mit dem p-Phenylendiamin hinzugesetzt ohne vorherige Einwirkung auf das Fermentpräparat, so ist die aktivierende Wirkung weniger energisch, namentlich wenn man kleine Pankreatinmengen verwendet (0,05 z. B.).

Ähnliche Resultate erzielt man mit dem Alkoholniederschlage des wässerigen Extraktes der Kartoffelschalen. Doch ist in dem Falle die Oxydation des p-Phenylendiamins natürlich bedeutend schwächer. Das Pankreatin beschleunigt auch energisch die Oxydation des Guajacs durch die Alkoholniederschläge des Lactarius vellereus.

Die auf Siedetemperatur erhitzten Alkoholniederschläge verlieren die Fähigkeit, p-Phenylendiamin zu oxydieren, und Zusatz von Pankreatin bleibt in dem Falle ohne Wirkung.

Durch Kochen wird die aktivierende Fähigkeit des Pankreatins weder aufgehoben noch vermindert. Andererseits dialysieren diese aktivierenden Substanzen mit großer Leichtigkeit. Es scheint demnach, daß die aktivierende Wirkung des Pankreatins nicht den darin enthaltenen Fermenten, aber anderen Substanzen zuzuschreiben sei.

Welcher Art sind nun diese Substanzen? Chodat[1]) hat gezeigt, daß die Aminosäuren die Oxydation des p-Kresols durch die Tyrosinoxydase unter Bildung verschiedener Färbungen aktiviert. Wir hielten es daher für angezeigt, zu untersuchen, ob das Pankreatin seine aktivierende Wirkung den darin enthaltenen Aminosäuren verdankt. Wir

---

[1]) Chodat, Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. Arch. des Sciences phys. et natur. **24**, 2, 1907; **33**, 70, 1912 und **33**, 225, 1912.

haben gefunden, daß die Aminosäuren ebenfalls die Fähigkeit besitzen, die Polyphenoloxydase zu oxydieren. Wir haben daraufhin das Glykokoll, das Alanin und das Leucin untersucht und haben bemerkt, daß das Alanin und das Leucin eine sehr geringe aktivierende Wirkung auf die Oxydation des p-Phenylendiamins durch den Alkoholniederschlag des wässerigen Lactarius vellereus ausübt. Das Glykokoll hat eine viel stärkere Wirkung als die obengenannten Aminosäuren, aber eine 10 bis 20 mal geringere als das Pankreatin. Es ist demnach wahrscheinlich, daß das Pankreatin seine aktivierende Fähigkeit wenigstens zum Teil den Aminosäuren oder anderen Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe verdankt. Wir haben keine weiteren Forschungen über diesen Punkt angestellt.

Die oxydierende Wirkung der Alkoholniederschläge des wässerigen Auszuges des Lactarius vellereus wird auch durch den wässerigen Auszug des Meerrettichs oder der Rübe aktiviert. Die aktivierende Fähigkeit dieser Extrakte wird durch Sieden nicht angegriffen. Diese Aktivierung kann also nicht auf Rechnung der Peroxydasen gesetzt werden.

Dieselbe aktivierende Fähigkeit besitzen auch die in dem wässerigen Auszuge des Lactarius nach der Alkoholfällung zurückbleibenden Substanzen. Der wässerige Auszug wird mit dem zwei- oder dreifachen Volumen Alkohol versetzt und filtriert. Das Filtrat wird durch Verdampfen im Vakuum vom Alkohol befreit. Die zurückbleibende Flüssigkeit hat an und für sich keinerlei Oxydationswirkung, bewirkt aber eine bedeutende Steigerung des Oxydationsvermögens des Alkoholniederschlags gegenüber p-Phenylendiamin.

Durch diese Tatsache wird es leicht verständlich, warum die aktivierende Wirkung des Pankreatins auf den frischen nicht vorbehandelten Lactarius vellereus ausgesprochener ist als auf den Alkoholniederschlag des wässerigen Auszuges desselben. In der Tat sind im ersten Falle die die Oxydase aktivierenden Substanzen im Lactarius selbst enthalten, während dieselben im zweiten Falle fehlen, da sie zum weitaus größten Teil in die Alkoholflüssigkeit übergegangen sind.

Wir müssen hier noch bemerken, daß die in Frage kommenden aktivierenden Substanzen keine Peroxydasen sind.

XII. Allgemeine Betrachtungen.

Wir wollen uns hier auf die Erörterung einiger Punkte beschränken, die uns von besonderer Wichtigkeit scheinen.

Ist die Oxydation des p-Phenylendiamins in den Tiergeweben der Einwirkung eines Katalysators zuzuschreiben?

Die in den Tiergeweben enthaltene Substanz oder Substanzen, die die Oxydation des p-Phenylendiamins beschleunigen, sind aller Wahrscheinlichkeit nach Katalysatoren. Sie beschleunigen die Oxydation, ohne in den Endprodukten der

Reaktion zu erscheinen. In der Tat sind die Oxydationsprodukte des p-Phenylendiamins in Gegenwart von Tiergeweben anscheinend ganz dieselben wie bei der spontanen Oxydation des p-Phenylendiamins in leicht alkalischem Medium oder bei der durch die pflanzliche Polyphenoloxydase bewirkten Oxydation. Die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Tiergewebe ist wahrscheinlich ebenfalls durch die Einwirkung eines Katalysators bedingt.

Sind die in den Tiergeweben enthaltenen Katalysatoren der p-Phenylendiamin- und der Bernsteinsäureoxydation als Fermente aufzufassen?

Die Mehrzahl der Forscher, die sich mit dem Studium der Indophenolreaktion durch die Tiergewebe befaßt haben, schrieben diese der Einwirkung einer Oxydase zu. Vernon nimmt ebenfalls an, daß es sich um ein Ferment handelt. Der Umstand, daß dieses Ferment in Wasser nicht löslich ist, ist nach Vernon kein Grund, um die Fermentnatur des Katalysators zu leugnen, da auch die Lipase in Wasser unlöslich sei.

Wir glauben jedoch, daß diese Frage ein eingehenderes Studium verlangt. Um in zufriedenstellender Weise die Frage zu beantworten, ob es sich im gegebenen Falle um eine Fermentwirkung handelt, muß man vor allen Dingen sich klar werden, welche Bedeutung man der Bezeichnung Ferment beilegt. Man könnte unter der Bezeichnung Ferment alle Katalysatoren organischer Natur verstehen, die durch lebende Gewebe produziert sind und einen gewissen Grad von Spezifität besitzen, ohne die anderen Eigenschaften (Löslichkeit, Hitzebeständigkeit usw.) in Betracht zu ziehen.

Die Mehrzahl der Forscher nimmt jedoch an, daß die Fermente eine gewisse Anzahl anderer Merkmale aufweisen müssen, wie z. B. Wasserlöslichkeit (allerdings sind einige Lipasen unlöslich in Wasser), Fällung durch Alkohol, Kolloidnatur, Empfindlichkeit gegen höhere Temperaturen usw. Begrenzt man auf diese Weise den Fermentbegriff, so ist es natürlich schwer, zu den Fermenten die Katalysatoren zu rechnen, die in den Tiergeweben die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure bedingen. Wir haben in der Tat gesehen, daß diese Katalysatoren in Wasser unlöslich sind und durch Alkohol- oder Acetonbehandlung vernichtet werden.

Aber selbst wenn der Fermentbegriff weit genug wäre, um ihn auch auf die soeben besprochenen Katalysatoren beziehen zu können, müßte man diese Katalysatoren in eine besondere, von den gewöhnlichen Oxydationsfermenten oder echten Oxydasen ganz verschiedene Klasse von Oxydationskatalysatoren einreihen. In der Tat wissen wir, daß im Gegensatz zu den Katalysatoren der p-Phenylendiamin- und der Bernsteinsäureoxydation die echten Oxydasen (Polyphenoloxydase, Tyrosinoxydase, Alkoholoxydase, Urikoxydase usw.) in Wasser löslich sind, durch Alkohol oder Aceton gefällt werden, durch die Pankreasfermente nicht beeinflußt werden usw.

Um die wichtigste Charaktereigentümlichkeit der Katalysatoren der p-Phenylendiamin- und der Bernsteinsäureoxydation anzudeuten, könnte man sie kurzweg als unlösliche Oxydationskatalysatoren bezeichnen.

Außer diesen unlöslichen Katalysatoren können einige Zellen und einige Flüssigkeiten des Tierorganismus auch eine echte Polyphenoloxydase enthalten, die in Wasser löslich ist, durch Alkohol oder Aceton gefällt wird usw. Eine solche Oxydase soll z. B. in den Leukocyten und im Speichel vorkommen.

In einer früheren Arbeit[1]) haben wir gezeigt, daß die Tiergewebe die Fähigkeit haben, die Citronen-, Apfel- und Fumarsäure zu verbrennen. Da es sich hier um eine vollständige Verbrennung handelt, ist es natürlich schwer zu entscheiden, ob man es hier bloß mit einem Oxydationskatalysator zu tun hat oder ob die genannten Säuren eine vorhergehende Umwandlung, eine Spaltung od. dgl. unter der Einwirkung anderer Katalysatoren durchmachen müssen. Wie dem auch sei, so steht eins fest, daß der die Oxydation dieser Säuren bewirkende Prozeß sehr labil ist. Er verschwindet recht bald nach dem Tode des Tieres und wird durch Auswaschen der Gewebe mit Wasser vernichtet.

In den Tiergeweben haben wir bis jetzt drei Typen von Oxydationskatalysatoren kennen gelernt, die die Fähigkeit haben, unter Aufnahme großer Sauerstoffmengen energische Oxydationen zu bewirken. Den ersten Typus bilden die echten Oxydasen, wie z. B. die Alkoholoxydase, die Urikoxydase u. a.

[1]) Battelli und Stern, Die Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe. Diese Zeitschr. 31, 478, 1911.

Man kann hierher auch die Tyrosinoxydase gewisser Insekten rechnen, die das Tyrosin mit großer Energie oxydiert. Den zweiten Typus stellen die unlöslichen Oxydationskatalysatoren vor, die man auch als stabile Katalysatoren bezeichnen könnte, da sie in den Geweben lange Zeit nach dem Tode des Tieres intakt bleiben und durch wiederholtes Auswaschen der Gewebe nicht vernichtet werden. Diese Katalysatoren sind es, die die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure beschleunigen. Der dritte Typus umfaßt einen labilen Katalysator oder mehrere Katalysatoren, von denen wenigstens einer labil ist. Dieser Katalysator verschwindet recht bald nach dem Tode des Tieres und wird durch längeres Auswaschen des Gewebes mit Wasser vernichtet. Die Citronen-, Apfel- und Fumarsäure werden durch die Einwirkung dieser labilen Katalysatoren verbrannt.

Sind die Katalysatoren der p-Phenylendiaminoxydation und der Bernsteinsäureoxydation identisch?

Wir haben bereits gesagt, daß im Gehirn der Katalysator der p-Phenylendiaminoxydation von dem der Bernsteinsäureoxydation verschieden ist. So bewirkt z. B. eine Temperatureinwirkung von 55° während 15 Minuten eine starke Herabsetzung des Oxydationsvermögens gegenüber p-Phenylendiamin, während die Oxydationsfähigkeit gegenüber Bernsteinsäure intakt bleibt. Außerdem oxydiert das Gehirn p-Phenylendiamin viel energischer als Bernsteinsäure, die Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure summiert sich usw. Es bleibt zweifelhaft, ob es sich in den anderen Geweben um einen oder zwei verschiedene Katalysatoren handelt, aber das letztere ist wahrscheinlich. Zu bemerken ist übrigens noch, daß das Blut, das Bernsteinsäure nicht anzugreifen vermag, ein recht hohes Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin aufweist. Wir können noch hinzufügen, daß der Lactarius vellereus, der so energisch p-Phenylendiamin oxydiert, die Bernsteinsäure nicht merklich angreift. Die Kartoffelschalen verhalten sich ebenso.

Beziehung zwischen dem Oxydationsvermögen und dem Grade der Sauerstoffsättigung eines Gewebes.

Vernon kommt in seinen Arbeiten über die Indophenoloxydase zur Schlußfolgerung, daß diejenigen Gewebe, die die größte Sauerstoffsättigung aufweisen und das Indophenolblau nicht reduzieren, die an Oxydase reichsten sind. Je stärker ein

Gewebe mit Sauerstoff gesättigt ist, um so größer ist auch das Oxydationsvermögen desselben. Wir haben bereits bei der Besprechung der Nachteile der Indophenolreaktion darauf hingewiesen, daß die Farbstoffbildung durch das Vorhandensein entfärbender (wahrscheinlich reduzierender) Substanzen völlig verhindert sein kann. Mangel an Färbung oder schwache Färbung sind nicht immer ein Beweis für die Armut eines Gewebes an Oxydationskatalysatoren. So sehen wir z. B., daß die Leber, die nur sehr schwach die Indophenolreaktion gibt und infolgedessen nach der Ansicht von Ehrlich und von Vernon einen geringen Sauerstoffsättigungsgrad besitzen muß, p-Phenylendiamin sowie das Indophenolreagens sehr energisch oxydiert, wie wir es bereits gesagt haben.

Spielen die Katalysatoren der p-Phenylendiaminoxydation und der Bernsteinsäureoxydation in der Hauptatmung der Gewebe eine Rolle?

Für den Augenblick ist es unmöglich, diese Frage definitiv zu beantworten. Zugunsten einer solchen Annahme spricht jedoch der Umstand, daß, wie wir bereits erwähnt haben, zwischen der Energie der Hauptatmung und der Intensität der Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure ein gewisser Parallelismus herrscht. Die Mengen des von einem gegebenen Gewebe aufgenommenen Sauerstoffs sind annähernd dieselben bei der Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins und bei der Hauptatmung.

Wir haben aber bereits darauf hingewiesen, daß dieser Parallelismus zwischen der Intensität der Hauptatmung und der Stärke der Oxydation des p-Phenylendiamins oder der Bernsteinsäure auch dem Umstande zugeschrieben werden kann, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen das Gewebe den maximalen Sauerstoffverbrauch aufweist. Dieses Maximum würde denselben Wert haben, gleichviel ob es sich um die Hauptatmung oder um die Oxydation der Bernsteinsäure oder des p-Phenylendiamins handelt.

Es versteht sich von selbst, daß selbst wenn man annimmt, daß die Katalysatoren der Oxydation des p-Phenylendiamins und der Bernsteinsäure bei der Hauptatmung eine Rolle spielen, dieselben der Mithilfe anderer Faktoren bedürfen. Es genügt daran zu erinnern, daß die Hauptatmung sehr labil

ist, während die ebengenannten Katalysatoren lange Zeit nach dem Tode des Tieres intakt bleiben, durch Auswaschen der Gewebe mit Wasser nicht beeinträchtigt werden usw. Der Mechanismus der Hauptatmung bleibt noch immer sehr dunkel.

XIII. Experimentelle Ergebnisse.

1. Die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe ist in Gegenwart gewöhnlichen Wassers am energischsten. Zusatz von geringen Mengen Alkali oder Säure setzt diese Oxydation herab.

2. In der Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe scheint es kein Temperaturoptimum zu geben. Die Oxydationsintensität ist bei 30°, 40° und 50° ungefähr gleich groß, allerdings erscheint sie bei 40° etwas größer. Bei 20° und 55° ist die Oxydationsintensität hingegen deutlich herabgesetzt.

Die auf 60° 10 Minuten lang erhitzten Gewebe büßen fast völlig die Fähigkeit ein, p-Phenylendiamin zu oxydieren

3. Die Neutralsalze bewirken in schwacher Konzentration eine deutliche Steigerung der p-Phenylendiaminoxydation durch die Tiergewebe. Erst in stärkeren Konzentrationen setzen diese Salze die Oxydationsintensität herab.

4. Die Oxydationsgeschwindigkeit nimmt mit steigender p-Phenylendiaminkonzentration bis zu einer gewissen Grenze zu.

5. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist in reinem Sauerstoff größer als in einer gewöhnlichen Luftatmosphäre.

6. Die die Oxydation des p-Phenylendiamins bewirkenden Substanzen können nicht aus den Geweben mit Wasser extrahiert werden. Nach wiederholtem Auswaschen der Gewebe mit Wasser bewahren die unlöslichen Teile der Gewebe das Vermögen, p-Phenylendiamin energisch zu oxydieren.

7. Die mit Alkohol oder Aceton behandelten Gewebe verlieren fast vollständig die Fähigkeit, p-Phenylendiamin zu oxydieren.

8. Durch Kontakt mit Mineralsäuren, selbst in schwacher Konzentration, verlieren die Gewebe ihr Oxydationsvermögen gegenüber p-Phenylendiamin. Bei gleicher Konzentration ist die zerstörende Wirkung der Alkalien stärker als die der Säuren.

9. Die wässerigen Auszüge der Gewebe oxydieren nach H_2O_2-Zusatz p-Phenylendiamin energisch. Diese Fähigkeit verdanken die Gewebeextrakte hauptsächlich dem darin enthaltenen

Hämoglobin. Durch Erhitzen auf Siedetemperatur wird dieses Vermögen nicht vernichtet.

Die gut ausgewaschenen Muskelrückstände sind nicht imstande, nach Erhitzen auf 60° p-Phenylendiamin in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd zu oxydieren. Desgleichen übt auch der gut gewaschene Muskelrückstand nach Behandlung mit Alkohol oder Aceton in Gegenwart von H_2O_2 keine oxydierende Wirkung auf p-Phenylendiamin aus.

Die Teilnahme einer Peroxydase oder einer analogen Substanz an der Oxydation des p-Phenylendiamins durch die Tiergewebe hat in unseren Versuchen nicht bewiesen werden können.

10. Unter dem Einflusse des Trypsins (Pankreatin) erleiden die Tiergewebe eine beträchtliche Verminderung ihres Oxydationsvermögens.

Das Pankreatin steigert hingegen die Oxydationswirkung des Blutes auf p-Phenylendiamin.

11. Das frische Pankreatin sowie das gekochte Präparat steigern die Oxydation des p-Phenylendiamins durch die pflanzliche Polyphenoloxydase. Diese Steigerung ist namentlich sehr ausgesprochen, wenn das Pankreatin einem Oxydasepräparat (Alkoholniederschlag) zugesetzt wird, das von den in Wasser löslichen, in dem Pflanzengewebe enthaltenen Substanzen befreit ist. Die wässerigen Auszüge (frisch oder gekocht) mehrerer Pflanzengewebe steigern ebenfalls die Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Oxydasepräparat. Diese Aktivierung ist nicht der Wirkung von Peroxydasen zuzuschreiben.

Die Aminosäuren, hauptsächlich das Glykokoll, steigern ebenfalls die Oxydation des p-Phenylendiamins durch das Oxydasepräparat, aber viel weniger energisch als das Pankreatin.

12. Die Katalysatoren, die in den Tiergeweben die Oxydation des p-Phenylendiamins oder der Bernsteinsäure bewirken, unterscheiden sich deutlich von den echten Oxydasen, da sie in Wasser unlöslich sind und durch Alkohol- oder Acetonbehandlung sowie durch das Trypsin vernichtet werden usw.

13. Im Gehirn scheint der Katalysator der p-Phenylenoxydation mit dem der Bernsteinsäureoxydation nicht identisch zu sein. Für die anderen Gewebe bleibt es zweifelhaft, ob es sich um einen einzigen oder zwei verschiedene Katalysatoren handelt.

Zur Chemie der normalen und Eklampsie-Placenta.

Von

L. Mohr und **W. Heimann.**

(Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Halle a. S.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Die Lehre von der placentaren Autointoxikation als Ursache der Eklampsie hat in der letzten Zeit immer festeren Boden gewonnen. Die alten nicht unwidersprochen gebliebenen Gründe für diese Auffassung haben in neuester Zeit vor allem durch die Entdeckung Abderhaldens[1]) eine mächtige Stütze gewonnen, der den Nachweis führte, daß das Blutserum von Schwangeren fermentative Eigenschaften gegen Placentareiweiß erlangt, eine Erscheinung, die darauf hinweist, daß auf parenteralem Wege Placentarbestandteile ins mütterliche Blut kommen. Damit hat die Lehre von der Zottendeportation ins mütterliche Blut einen biologischen Ausdruck gefunden. Nun muß man allerdings anerkennen, daß hiermit noch nicht bewiesen ist, daß die parenterale Einschleppung von Placentareiweiß als regelmäßige Erscheinung in der Gravidität auch ursächliche Bedeutung für die Eklampsie hat. Wenn tatsächlich eine solche pathogenetische Beziehung vorliegt, muß, damit der Schwangerschaftsverlauf pathologisch wird, noch etwas zu diesem Vorgang hinzukommen. Es kann sich dabei entweder handeln um eine besondere Empfindlichkeit gegen die parenterale Placentareiweißverschleppung, vielleicht infolge mangelhafter Fermenttätigkeit und dadurch ungenügender Abwehr, was als Ausdruck individueller Disposition gelten kann — oder es treten Placentarbestandteile in abnormer Menge oder in abnormer Zusammensetzung in das mütterliche Blut über. Nur der letztere Gesichtspunkt soll uns hier beschäftigen. Von ihm

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 77, S. 249ff.

aus stellt sich die Frage nach Differenzen in der chemischen Zusammensetzung normaler und eklamptischer Placenten. Bisher liegen nur spärliche Vergleichsdaten vor.

Zu erwähnen ist die Arbeit von Dryfuß[1]). Er fand, daß der lösliche Gesamt-N bei dem frischen eklamptischen Organ fast auf das Doppelte vermehrt war (1,86:1,0) und fast den Wert bei der normalen, aber autolytisierten Placenta (2,0:1,0) erreichte, ferner daß der Wert des löslichen Gesamtstickstoffes bei der eklamptischen autolysierten Placenta auf etwa den 3fachen Wert als bei der frischen normalen (3,1:1) und auf den $1^1/_2$fachen der normalen autolysierten (1,54:1) anstieg. Dreyfuß fand als gesamtlöslichen N in 100 g feuchter Placenta:

Plac.	normal	frisch	0,1328 g
„	„	autolysiert	0,2664 g
„	Eklampsie	frisch	0,2483 g
„	„	autolysiert	0,4118 g

Diese Unterschiede deuten nach dem Verfasser auf autolytische Vorgänge im eklamptischen Organ hin. Ferner wurde das Verhältnis des Amidstickstoffes zum Gesamtstickstoff des eklamptischen Organes gegenüber dem normalen autolysierten relativ erhöht gefunden. Verfasser schließt daraus, daß das desamidierende Enzym in der eklamptischen Placenta relativ wirksamer als die autolytischen Fermente ist. Dryfuß konnte sowohl Monoamino- wie Diaminosäuren nachweisen.

Von Murray ist bei der eklamptischen Placenta „ein weit höherer Lipoidgehalt als bei der normalen, sonst kein abweichendes Verhalten beider“ gefunden worden. Analysenzahlen sind mir, da ich die Arbeit nur aus einem Referat kenne, nicht bekannt geworden. Mohr und Freund[2]) haben Ölsäure in der Placenta gefunden; Polano[3]) hat ihre Menge in normaler Placenta auf 0,34 g, in der eklamptischen auf 0,729 g bestimmt[4]).

II.

Unsere eigenen Untersuchungen beschäftigen sich mit den Fett- und fettartigen Substanzen der normalen und eklamptischen Placenta[5]).

---

1) Diese Zeitschr. 7, 492, 1908.

2) Berliner klin. Wochenschr. 1908, 40.

3) Zeitschr. f. Geburtshilfe u. Gynäkol. 65, 581.

4) Die während der Drucklegung erschienene Arbeit von Bianca Binenfeld, diese Zeitschr. 43, 225, konnte leider nicht mehr berücksichtigt werden.

5) Das Material — 6 normale und 7 eklamptische Placenten — erhielten wir durch das liebenswürdige Entgegenkommen des Herrn Geheimrat Veit von der Universitäts-Frauenklinik zu Halle a. S., wofür wir ihm ganz ergebenen Dank auch an dieser Stelle aussprechen. Die Versuchsresultate sind bereits kurz mitgeteilt: Mohr, Münch. med. Wochenschr. 1908, 2551.

Methodik.

1.

Die analytischen Bestimmungen wurden an dem aus dem frischen Organ hergestellten Trockenpräparat vorgenommen. Das möglichst sofort oder nach kurzem Aufenthalt auf Eis in Arbeit genommene Organ wurde folgendermaßen präpariert: Sichtbare Blutkoagula wurden entfernt, Nabelschnur und Eihäute sorgfältig abgetrennt, dabei größere Gefäße ebenfalls mit fortgenommen. Der Kuchen wurde dann unter einem dünnen Wasserstrahl zwischen den Händen leicht ausgepreßt, so daß das äußerlich anhaftende und in den großen eröffneten Gefäßen leicht zugängliche Blut entfernt wurde, in seiner Hauptmasse aber in dem schwammigen Gewebe zurückblieb. Durch Abtupfen mit Filtrierpapier wurde das anhaftende Wasser wiederum fortgenommen, das Organ sodann mehrmals durch die Fleischhackmaschine getrieben, wobei größere Gefäße mit der Pinzette möglichst aus dem Brei entfernt wurden und der Brei sodann in mehreren flachen Schalen in dünner Schicht ausgebreitet. Nunmehr wurde das Gewicht bestimmt und die Breimasse im Ventilator bei etwa 30° unter häufigem Umrühren zur Erneuerung der Oberfläche getrocknet. Gewöhnlich war schon nach 5 bis 6 Stunden die Hauptmasse des Wassers abgedunstet, die Oberfläche der einzelnen Bröckel trocken, diese im Inneren aber noch feucht. Sie wurden daher möglichst zerschnitten, zunächst im Ventilator noch einige Stunden weiter getrocknet, sodann im evakuierten Exsiccator bis zur völligen Trockne belassen. Aus dem nunmehr festgestellten Gewicht ergab sich durch Subtraktion vom Naßgewicht Wassergehalt und Trockengewicht. Das Präparat wurde nunmehr in der Pulvermühle möglichst zu einem stäubenden Pulver gemahlen und im evakuierten Exsiccator im Dunkeln bis zur Verarbeitung aufgehoben.

2.

In dem Pulver wurden einige Male Phosphor, Stickstoff, Fettsäuren und Unverseifbares bestimmt, ferner jedesmal eine Fettextraktion vorgenommen und in dem erhaltenen Extrakt Fettsäure, Unverseifbares, Phosphor und Stickstoff bestimmt.

Zur Phosphorbestimmung wurde das Pulver, bzw. das Extrakt auf nassem Wege verascht, der Phosphor alkalimetrisch als phosphormolybdänsaurer Ammoniak nach A. Neumann bestimmt und die Modifikation von Gregersen angewandt. Die Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt.

Die Fettsäuren — und zwar nur die hohen — sowie das Unverseifbare, das im wesentlichen wohl als Cholesterin aufzufassen ist, wurden sowohl im Pulver wie im Extrakt nach der Verseifungsmethode von Kumagawa und Suto[1]) bestimmt.

Die Fettextraktion beruhte im wesentlichen auf der Anwendung

[1]) Diese Zeitschr. 8, 212.

des absoluten Alkohols im Soxhletschen Fettextraktionsapparat. Anfangs geschah noch eine Nachextraktion mit Äther und Chloroform, später nur mit Äther. Bei genügend langer Extraktion mit Alkohol und großer Feinheit des Pulvers war schon hierdurch allein die Extraktion eine nahezu vollständige, wie wir uns mehrfach überzeugen konnten. Einige Vorsichtsmaßregeln wurden beobachtet, um eine Zersetzung des Lecithins nach Möglichkeit während der Extraktion zu vermeiden. Das Wasserbad wurde, um es konstant zu halten, mit einem Thermoregulator versehen, die Temperatur des Alkohols in dem Extraktionskölbchen wurde mit einem durch den Gummistopfen des Kölbchens in die Flüssigkeit eintauchenden Thermometer kontrolliert. Um die zum Sieden notwendige Temperatur möglichst tief zu halten, wurde nach Möglichkeit jede Anwesenheit von Wasser ferngehalten. Es wurde über geglühtem Kupfersulfat aufgehobener absoluter Alkohol verwandt; es wurde ferner das durch Differenzwägung abgewogene und in die Papierpatrone geschüttete Pulver bis zu dem Moment im Exsiccator aufgehoben, wo es möglichst schnell in den Soxhletapparat geschoben wurde; ferner stand der Rückflußkühler mit einem Chlorcalciumturm in Verbindung, um das Anziehen von Wasser aus der Luft zu vermeiden. Die kontrollierte Temperatur des siedenden Alkohols betrug zwischen 79 und 81°. Um eine vorzeitige Kondensation zu vermeiden, wurde das zur oberen Hälfte des Soxhlet führende Dampfrohr mit Watte umwickelt und der ganze Extraktionsapparat in eine Papp- oder Asbestrolle eingeschlossen. Die Extraktion wurde mit jedem Extraktionsmittel 24 Stunden durchgeführt.

Die gewonnenen Extrakte wurden durch Asbest- und Glaswolle filtriert und durch Verdunstenlassen auf dem Wasserbad und im Ventilator und Wiederaufnehmen des auf 50° erwärmten Rückstandes in Äther und Filtration mehrfach gereinigt und schließlich im Maßkolben auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Eine bisweilen nachträglich auftretende Trübung wurde durch nochmalige Filtration beseitigt, worauf die in Äther gelösten Extrakte, im Dunkeln aufbewahrt, klar blieben. Aliquote Teile wurden für die oben genannten Bestimmungen abpipettiert und das Gewicht des Gesamtextraktes ebenfalls aus dem Verdunstungsrückstand eines aliquoten Teiles berechnet.

Die Berechnung des Distearyllecithins geschah aus Phosphorpentoxyd (P_2O_5) durch Multiplikation mit dem Faktor 11,38. Das P_2O_5 wurde aus der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter $^n/_2$-NaOH, die zur Lösung des phosphormolybdänsauren Ammoniaks nötig waren, berechnet (vgl. Hoppe-Seyler, Lehrbuch usw. S. 554 u. 664).

Von den im Ätherextrakt gefundenen hohen Fettsäuren wurde ein Teil als Stearinsäure für das Lecithin in Rechnung gesetzt, indem 70,39% von der auf Phosphor bestimmten Lecithinmenge von dem Gewicht der Fettsäuren in Abzug gebracht wurden.

Der Rest an Fettsäuren wurde als Neutralfett berechnet, durch Multiplikation mit dem Faktor 1,046, wie es von Kumagawa und Suto (s. S. 237) begründet wird.

Meine Resultate habe ich in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

	Trockensubstanz	Wassergehalt		Ges.-P_2O_5	Gesamt-N	Ges. {Fettsäure + Unverseifb.}		Ätherlösliches	Distearyllecithin	Cholesterin	Neutralfett
				1. Normale Placenten.							
A.	13,3	86,7	Auf 100 g Trockensubstanz %	—	—	—	Auf 100 g Trockensubstanz %	13,3	4,776	1,605	—
B.	14,6	85,4		—	—	—		12,6	5,262	1,209	—
C.	15,3	84,7		—	—	—		8,79	3,96	2,282	0,95
D.	17,7	82,3		—	—	—		13,03	3,93	1,79	3,246
E.	16,4	83,6		—	—	4,94		7,8	4,401	0,84	0,926
F.	17,17	82,83		2,0	13,7			28,96	3,972	—	7,292
Mittel	15,75	84,25		2,0	13,7	4,94		15,75	4,3835	1,546	3,103
				2. Eklampsie-Placenten.							
G.	15,6	84,4	Auf 100 g Trockensubstanz %	—	—	—	Auf 100 g Trockensubstanz %	9,33	2,874	1,391	—
H.	13,7	86,3		—	—	—		9,74	2,412	1,18	—
J.	11,8	88,2		—	—	—		12,34	2,921	—	—
K.	11,98	88,02		—	—	—		13,42	2,23	—	—
L.	10,7	89,3		—	—	—		10,7	1,8	1,874	—
M.	19,04	80,96		—	—	4,495		8,68	2,734	1,736	2,813
N.	15,64	84,36		2,196	14,33	4,099		18,08	4,0	3,61	4,91
Mittel	14,07	85,93		2,196	14,33	4,297		11,76	2,71	1,958	3,862

Die Stickstoffbestimmungen aus dem Extrakt habe ich nicht zusammengestellt, da ihre Werte außerordentlich differieren, was auf ein Mehr oder Weniger von Verunreinigungen zu beziehen ist, die in das Extrakt übergehen. Insbesondere ist es nicht möglich, aus ihrer Menge eine Beziehung zum Phosphor und damit eine Bestimmung der Menge und der Art des Lecithins zu gewinnen, worauf auch schon Kumagawa und Suto hingewiesen haben.

Wassergehalt und Trockensubstanz ist bei der normalen und eklamptischen Placenta ziemlich gleich. Die Durchschnittswerte für den gesamten Lipoidgehalt bei der Eklampsie-Placenta geringer. Doch schwanken innerhalb der gleichen Reihen die Werte beträchtlich. Eine sichere Erklärung ist uns nicht möglich.

Bemerkenswert in der Tabelle ist das Verhalten des organischen P, der als Distearyllecithin berechnet ist. In der Placenta der Eklamptischen ist mit Ausnahme der Placenta 13

der organische P beinahe um die Hälfte vermindert. Das Verhältnis der normalen zur eklamptischen beträgt 1 : 0,618. Eine analoge chemische Eigentümlichkeit von Organen kennen wir bisher nur unter zwei Umständen: der Verfettung bei Vergiftungen und der Autolyse. Bei der P-Vergiftung hat Heffter in der Leber eine Abnahme des Lecithins um ca. 50 % gefunden. In vielen (noch nicht publizierten) Untersuchungen, die im Laboratorium der medizin. Poliklinik von Mohr, Jastrowitz und Heimann ausgeführt sind, ist das gleiche fast durchweg bei allen degenerativen organischen Vergiftungen festgestellt worden. Bei der Autolyse von Organen hat Waldvogel eine Abnahme des organischen P gefunden. Während Friedemann annimmt, daß es sich hierbei um eine Lecithidbildung annimmt, ähnlich der Lecithidbildung bei Vergiftung mit Kobragift, sehen Joannovics und Pick darin den Ausdruck eines Abbaues von lipoiden Substanzen, wobei ungesättigte Fettsäuren entstehen, die hämolytische Wirksamkeit haben.

Auch bei der Placenta von Eklamptischen ist zunächst an autolytische Vorgänge zu denken, die infolge der Spaltung P-haltiger Lipoide zur Bildung solcher Körper geführt haben. Eingangs ist auf die Arbeit von Dreyfuß hingewiesen worden, der bezüglich der Eiweißkörper der Placenta von Eklamptischen autolytische Vorgänge nachgewiesen hat. Man wird demnach annehmen dürfen, daß diese sich auch auf die Lipoide erstrecken. Die Frage ist nur, haben diese Vorgänge biologische Bedeutung oder nicht, mit anderen Worten: findet die Autolyse in vivo oder erst außerhalb des Körpers statt. Aber selbst wenn man mit der letzteren Möglichkeit nur rechnen dürfte, so bleibt doch die Tatsache merkwürdig, daß die Placenta bei Eklampsie zu stärkerem autolytischen Zerfall neigt als die normale. Wir haben versucht, eine Entscheidung der Frage zu treffen, indem wir die Autolyse durch sofortiges Einbringen der Placenta in absoluten Alkohol und mehrstündiges Stehenlassen ausschalteten. Das Organ wurde danach in derselben Weise wie früher verarbeitet, und ergab folgende Werte: Ätherlösliches 8,1 %, Fettsäuren + Unverseifbares 4,34 %, Distearyllecithin 2,71 %. Auch hierbei trat der Unterschied im Lecithingehalt wieder hervor. Auf Distearyllecithin berechnet, wurden 2,71 % gefunden, also gleichfalls eine Verminderung um beinahe die

Hälfte des Gehalts normaler Placenten. Damit ist wohl bewiesen, daß in der Tat die Änderung in der Zusammensetzung im Körper eintritt und nicht außerhalb desselben während der Verarbeitung. Damit ist aber gleichzeitig eine wichtige biologische Tatsache statuiert, die in dem Krankheitsbilde der Eklampsie eine Rolle spielen kann. In der chemischen Entartung der Placenta erkennt man die Auflösung, in der das Organ sich befindet. Es ist unter diesen Umständen der Übergang placentarer Stoffe in das mütterliche Blut sicher erleichtert, also schon nach der quantitativen Seite ein Unterschied gegen die Norm vorhanden. Es muß aber noch berücksichtigt werden, daß im Abbau begriffene Substanzen (Eiweiß und Fettsubstanzen) in den Kreislauf kommen. Von gewissen Eiweißzwischenprodukten ist bekannt, daß sie giftige Wirkungen haben. Von den bei der Organverfettung und der Autolyse auftretenden Lipoiden ist bekannt, daß sie starke hämotoxische Eigenschaften haben. Bei der Identität dieser chemischen Veränderungen mit denen, die in der eklamptischen Placenta nach unsern Versuchen vorhanden sind, darf man die Bildung von wirksamen Hämolysinen in der Eklampsieplacenta annehmen, die vielleicht zusammen mit anderen Lipoiden, z. B. Ölsäure (Mohr und Freund), gelegentliche Ursache der schweren Blutveränderungen in der Schwangerschaft sind.

Über die Adsorption durch Tone. IV.

Von

Paul Rohland.

(Aus dem Institut für Elektrochemie und technische Chemie der Technischen Hochschule zu Stuttgart.)

(Eingegangen am 3. Oktober 1912.)

In meinen bisherigen Untersuchungen[1]) über die Adsorption durch Tone war gefunden worden, daß kolloidreiche Tone kompliziert zusammengesetzte Farbstoffe künstlicher, tierischer und pflanzlicher Natur adsorbieren. Als solche kommen in Betracht:

1. Teerfarbstoffe, wie Anilinrot, Anilinblau, Malachitgrün, Eosin u. a.;

2. tierische Farbstoffe, wie Carmin, der Farbstoff des Urins;

3. pflanzliche Farbstoffe, wie Orseille, der Farbstoff der Rübe u. a.

Ihre Adsorption beruht darauf, daß auch sie in konzentrierteren Lösungen polymerisiert-kolloid sind.

Von kolloidreichen Tonen werden nicht adsorbiert einfach zusammengesetzte, krystalloide, gefärbte Substanzen, wie Kalidichromat, Cuprisulfat u. a.

Unter den pflanzlichen Farbstoffen scheinen einige Ausnahmen vorzukommen. Gelegentlich zahlreicher Versuche, die Abwässer der Sulfitcellulosefabriken mit Hilfe meines „Kolloidtonreinigungsverfahrens"[2]) zu entfärben, zu reinigen und geruchlos zu machen, ergab sich, daß der Farbstoff der Ablaugen nicht von solchen Ionen adsorbiert wird.

Die Ablaugen der Sulfitcellulosefabriken haben etwa folgende Zusammensetzung:

---

[1]) Diese Zeitschr. 1909 bis 1912.

[2]) Vgl. P. Rohland, Das Kolloidtonreinigungsverfahren für städtische Ab- und Fabrikwässer. Chem. Ind. 33, 519, 1910.

Gesamtglühverlust . . .	9,43 %
Lignin	6,00 "
Schweflige Säure	0,20 "
Kohlenhydrate	3,25 "
Protein	0,15 "
Harz und Wachs	0,03 "
Kalk	0,90 "

Diese Substanzen sind teils krystalloider, teils kolloider Natur; über die Konstitution des gelbbraunen Farbstoffes ist, soweit ich die Literatur darüber durchsucht habe, nichts Genaues bekannt.

Sowohl auf Zusatz von Wasserstoffionen wie von Hydroxylionen tritt eine Farbvertiefung ein; die Farbe wird dunkelbraun bis schwarz.

Die gelbbraune Farbe ließ allerdings die Vermutung zu, daß Ferriionen in der Lösung des Farbstoffes vorhanden sind; aber die üblichen Ferriionenreaktionen versagen. Dagegen tritt auf Zusatz von Ferrocyankalium nach einiger Zeit die tiefe grünblaue Färbung des „Berlinerblau" auf. Die Ferriionen des Farbstoffes vereinigen sich mit den Ferroionen des Ferrocyankaliums zu den Ferroferriionen des Berlinerblaus.

Daraus aber, daß der Farbstoff nicht von Kolloidtonen adsorbiert wird, läßt sich schließen, daß er eine wesentlich andere Konstitution als die Anilinfarbstoffe und auch die anderen pflanzlichen Farbstoffe, die adsorbiert werden, hat; er steht, da er aus der Holzfaser stammt, vielleicht dem Chlorophyll nahe. Da dieses nicht in Wasser löslich ist, läßt sich ein Adsorptionsversuch mit Ton leider nicht ausführen.

Ist aber die Umwandlung des Farbstoffes in Berlinerblau erfolgt, so kann die Adsorption durch Tone stattfinden, da dieses eine zusammengesetzte und kolloide Struktur hat; wie ich schon früher gefunden habe, wird Berlinerblau von Kolloidton adsorbiert[1]). Es ist also möglich, den Farbstoff der Sulfitcelluloseablauge aus dieser, wenn auch auf einem Umwege, zu entfernen.

---

[1]) Vgl. P. Rohland, Über die Adsorptionsfähigkeit der Hydroxyde des Li, Al, Fe. Zeitschr. f. anorgan. Chem. 1912, 116.

Über den Kieselsäuregehalt der menschlichen Schilddrüse.

Von

Hugo Schulz.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1912.)

Im weiteren Verfolge meiner Arbeiten über die Stellung die die Kieselsäure im Aufbau der menschlichen Organe einnimmt, habe ich im Laufe des letzten Jahres eine größere Anzahl von Schilddrüsen auf ihren Kieselsäuregehalt hin untersucht. Durch die freundliche Unterstützung, die ich bei der Beschaffung des Materials von meinen hiesigen, sowie auch von Zürcher Herren Kollegen erfuhr, wurde ich in die günstige Lage versetzt, Vergleiche anstellen zu können, die hinsichtlich des Herkommens der Schilddrüsen ein recht interessantes Ergebnis geliefert haben. Ich hatte von vornherein beabsichtigt, nicht allein normale Schilddrüsen zu untersuchen, sondern auch solche, die strumös degeneriert waren.

Von letzteren erhielt ich im ganzen 12 Stück durch den Direktor des Zürcher Pathologischen Instituts, Professor Otto Busse, und den Direktor des dortigen Kantonspitals, Professor Ferdinand Sauerbruch. 9 Strumen wurden mir durch den Direktor der hiesigen Chirurgischen Klinik, Professor Pels-Leusden, und den Direktor des Pathologischen Instituts, Professor Paul Grawitz, zur Verfügung gestellt. Außerdem erhielt ich von letzterem noch 35 normale Schilddrüsen. Es ist mir eine angenehme Pflicht, den Herren Kollegen an dieser Stelle meinen Dank für ihr Entgegenkommen aussprechen zu dürfen.

Die Bestimmung der Kieselsäure in den veraschten Schilddrüsen wurde in der Weise ausgeführt, wie ich sie bei Gelegenheit meiner Untersuchungen über den Übergang von Kieselsäure in den menschlichen Harn im Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 144, S. 350 ausführlich mitgeteilt habe. Außerdem wurden in jedem einzelnen Falle der Wassergehalt und die Trocken-

substanz der einzelnen Drüsen bestimmt. Was etwa Besonderes für die einzelnen Analysen anzugeben war, findet sich bei ihnen speziell bemerkt.

I. Greifswalder Material.

a) Normale Organe.

Die ersten hier mitgeteilten Analysen sind Sammelanalysen. Ich konnte im voraus nicht wissen, wie hoch der Durchschnittsgehalt an Kieselsäure bei den einzelnen Schilddrüsen sich belaufen würde. Es kam zunächst darauf an, so viel Kieselsäure überhaupt herauszuarbeiten, daß diese sich mit Sicherheit gewichtsanalytisch bestimmen ließ.

7 Schilddrüsen zusammen analysiert. Herkunft und Gewicht: 50 jährige Frau, Pneumonie, interstitielle Nephritis, 22,85 g. — 62 jähriger Mann, Aortenstenose, 41,46 g. — 56 jähriger Mann, Lebercirrhose, Nephritis, 111,40 g. — 92 jähriger Mann, Pneumonie, 14 g. — 61 jährige Frau, Pneumonie, 26,25 g. — 63 jährige Frau, Pericarditis, 41,7 g. — 54 jähriger Mann, Tabes, Lues, 19,09 g.

Gesamtgewicht: 176,79 g.

Bei dieser ersten Kieselsäurebestimmung hatte ich, wie schon bemerkt, alles Material zusammen genommen, was ich bis dahin erhalten hatte. So kommt es, daß auch die Schilddrüse mit dem hohen Gewicht von 111,40 g mit in diese Analyse hineingeraten ist. Beim Zerkleinern der Drüsen konnte ich makroskopisch keine Besonderheiten ihrer Struktur wahrnehmen, auch keine Anhäufung abnormer Substanz in ihrem Innern.

Ergebnis:
Wassergehalt: 79,3305 %.
Trockensubstanz: 20,6695 %.
Verarbeitetes Material: 36,5417 g = 0,0019 g SiO_2 [1]).
Die Trockensubstanz enthält: 0,0052 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0011 % SiO_2.

2.

Während die vorhergehende Analyse die Zahlen liefert, die aus der Untersuchung von Schilddrüsen älterer Individuen sich ergeben hatten, bringt diese die aus jugendlichem Material gewonnenen Werte.

7 Schilddrüsen. Herkunft und Gewicht: 30 jähriger Mann, Pneumonie, 25,07 g. — 15 jähriger Junge, Peritonitis, 9,03 g. — 5 jähriger Junge, Myocarditis, 3,02 g. — 1 jähriger Knabe, Diphtherie, 1,43 g. — 4 jähriger Knabe, Diphtherie, 2,75 g. — 26 jährige Frau, Tuberkulose, 10,85 g. — 23 jähriges Mädchen, Suicidium, Salzsäure, 23,56 g.

Gesamtgewicht: 75,71 g.
Wassergehalt: 75,5936 %.

---

1) Das „verarbeitete Material" entspricht der gesamten Trockensubstanz, auf die die SiO_2-Werte verrechnet wurden.

Trockensubstanz: 24,4064 %.
Verarbeitetes Material: 18,4781 g = 0,0023 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0124 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0030 % SiO_2.

3.

8 Schilddrüsen. Herkunft und Gewicht: Alle Drüsen stammten von an Tuberkulose zugrunde gegangenen Individuen. 20 jähriger Mann, 16,24 g. — 14 jähriger Knabe, 6,37 g. — 19 jähriger Mann, 8,68 g. — 14 jähriges Mädchen, 6,80 g. — 25 jährige Frau, 27,58 g. — 28 jähriger Mann, 21,0 g. — 29 jähriges Mädchen, 30,51 g. — 38 jähriger Mann, 24,46 g.
Gesamtgewicht: 143,64 g.
Wassergehalt: 76,9542 %.
Trockensubstanz: 23,0458 %.
Verarbeitetes Material: 33,1030 g = 0,0025 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0076 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0017 % SiO_2.

4.

6 Schilddrüsen, sämtlich von Tuberkulosen. Herkunft und Gewicht 30 jähriger Mann, 34,13 g. — 64 jähriger Mann, 24,31 g. — 29 jähriges Mädchen, 37,26 g. — 51 jährige Frau, 13,98 g. — 19 jähriges Mädchen, 18,25 g. — 23 jähriger Mann, 15,19 g.
Gesamtgewicht: 143,12 g.
Wassergehalt: 77,6141 %.
Trockensubstanz: 22,3859 %.
Verarbeitetes Material: 32,0398 g = 0,0023 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0072 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0016 % SiO_2.

5.

6 Schilddrüsen, sämtlich von über 50 Jahre alten Personen. 54 jähriger Mann, Sepsis, 21,56 g. — 59 jähriger Mann, Tuberkulose, 16,26 g. — 78 jährige Frau, Pneumonie, 9,90 g. — 53 jährige Frau, Nephritis, 11,80 g. — 54 jähriger Mann, Pneumonie, 34,17 g. — 51 jährige Frau, Nephritis, 19,37 g.

An keiner der Schilddrüsen war mit bloßem Auge eine Abweichung vom normalen Verhalten wahrzunehmen.
Gesamtgewicht: 113,06 g.
Wassergehalt: 77,2662 %.
Trockensubstanz: 22,7338 %.
Verarbeitetes Material: 25,7028 g = 0,0017 % SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0066 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0015 % SiO_2.

6.

52 jähriger Mann. Tod durch Peritonitis nach einer Darmruptur durch Hufschlag.

Gewicht: 31,95 g.
Wassergehalt: 71,8391 %.
Trockensubstanz: 28,1609 %.
Verarbeitetes Material: 8,9974 g = 0,0016 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0178 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0050 % SiO_2.

7.

71 jährige Frau, Tod durch Pneumonie.
Gewicht: 19,38 g.
Wassergehalt: 73,4025 %.
Trockensubstanz: 26,5985 %.
Verarbeitetes Material: 5,1548 g = 0,0004 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0078 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0021 % SiO_2.

8.

25 jährige Frau. Tod durch Sepsis nach Abort. In der sonst ganz normal aussehenden Schilddrüse vereinzelt geringe Ablagerung weißgelblicher Masse.
Gewicht: 28,64 g.
Wassergehalt: 75,1795 %.
Trockensubstanz: 23,8205 %.
Verarbeitetes Material: 6,8222 g = 0,0002 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0029 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0007 % SiO_2.

b) Strumen.

9.

23 jähriger Mann. Tod durch Bronchopneumonie. In der Schilddrüse eine große, mit gelbbraunem, gelatinösem Inhalt gefüllte Cyste.
Gewicht: 69,03 g.
Wassergehalt: 76,4831 %.
Trockensubstanz: 23,5169 %.
Verarbeitetes Material: 16,2337 g = 0,0025 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0154 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0036 % SiO_2.

10.

42 jährige Frau. Tod durch Verblutung nach einer Operation. Die Schilddrüse enthält keine Cyste, ist ganz mit weißgelber Masse ausgefüllt.
Gewicht: 147,48 g.
Wassergehalt: 73,1633 %.
Trockensubstanz: 26,8367 %.
Verarbeitetes Material: 39,5788 g = 0,0011 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0028 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0008 % SiO_2.

11.

30 jährige Frau. Lysolvergiftung. Schilddrüse auf dem Durchschnitt glasig geschwollen.

Gewicht: 62,29 g.

Wassergehalt: 73,8085 %.

Trockensubstanz: 26,1915 %.

Verarbeitetes Material: 15,3404 g = 0,0015 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0092 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0024 % SiO_2.

12.

Struma von einer weiblichen Leiche mittleren Alters herrührend. Durchweg kolloidal.

Gewicht: 254,98 g.

Wassergehalt: 71,1328 %.

Trockensubstanz: 28,8672 %.

Verarbeitetes Material: 73,6056 g = 0,0062 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0084 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0024 % SiO_2.

13.

Diese, wie die folgenden Analysen betreffen aus der hiesigen Chirurgischen Klinik stammendes Material. Basedow-Struma, die die halbseitige Exstirpation notwendig gemacht hatte.

Gewicht: 24,76 g.

Wassergehalt: 79,8764 %.

Trockensubstanz: 20,1236 %.

Verarbeitetes Material: 4,9826 g = 0,0010 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0201 g SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0040 % SiO_2.

14.

32 jährige Patientin. Typischer Basedow. Besteht angeblich seit etwa 2 Jahren.

Gewicht: 45,30 g.

Wassergehalt: 81,8603 %.

Trockensubstanz: 18,1397 %.

Verarbeitetes Material: 8,2173 g = 0,0012 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0146 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0026 % SiO_2.

15.

Im Innern durchweg homogen aussehende Struma von einer weiblichen Patientin.

Gewicht: 119,76 g.

Wassergehalt: 71,8530 %.

Trockensubstanz: 28,1470 %.

Verarbeitetes Material: 33,7087 g = 0,0128 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0379 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0107 % SiO_2.

16.

44 jährige Frau. Geschwulst seit 4 Jahren bemerkt.

Gewicht: 111,33 g.

Wassergehalt: 76,2786 %.

Trockensubstanz: 23,7214 %.

Verarbeitetes Material: 26,4099 g = 0,0073 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0276 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0065 % SiO_2.

17.

Typische Basedow-Struma, wie die vorigen auf dem Durchschnitt nichts Besonderes bietend.

Gewicht: 70,0 g.

Wassergehalt: 79,5703 %.

Trockensubstanz: 20,4297 %.

Verarbeitetes Material: 14,3008 g = 0,0031 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0217 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0044 % SiO_2.

II. Zürcher Material.

18.

Aus dem Pathologischen Institut. 70 jährige Frau. Braune Atrophie des Herzens. Hypertrophie des linken Ventrikels. Drüse größtenteils homogen, an einzelnen Stellen harte, weißliche Konkremente, vereinzelt weißgelbe Herde.

Gewicht: 270,0 g.

Wassergehalt: 77,2216 %.

Trockensubstanz: 22,7784 %.

Verarbeitetes Material: 61,5017 g = 0,0040 g SiO_2.

Die Trockensubstanz enthält: 0,0065 % SiO_2.

Die frische Substanz enthält: 0,0015 % SiO_2.

Bei Gelegenheit dieser Analyse machte ich eine eigenartige Beobachtung. Wie immer war das Drüsengewebe zuerst in der Muffel verascht worden, darauf die Asche wiederholt mit konzentrierter Salzsäure behandelt und schließlich noch geraume Zeit bei einer Temperatur von 120° stehen gelassen. Als nun der Trockenrückstand mit warmer Salzsäure aufgenommen war und dasGelöste vom Ungelösten abfiltriert wurde, färbte sich das Filter zunehmend bis schließlich tief blauviolett. Bei vorsichtigem Anwärmen des Filters verschwand diese Färbung völlig wieder. Die Erscheinung deutete auf die Anwesenheit von reichlich viel Jod hin. Herr Professor Busse teilte mir dann mit, daß behufs Vornahme der, übrigens resultatlos ausgefallenen, Amyloidreaktion die Schnittflächen der durchschnittenen Drüse mit Jodlösung behandelt seien. So erklärte sich denn das Auftreten von Jod auf dem Filter einfach. Aber es ist doch sehr bemerkenswert, daß das Jod alle die vorher erwähnten eingreifenden Prozeduren ausgehalten hatte, ohne sich, wie man hätte

annehmen können, dabei als solches oder in irgendwelcher Verbindung zu verflüchtigen. Dieselbe Erscheinung habe ich weiterhin noch einmal beobachtet.

19.

53jährige Frau. Appendicitis, Phlegmone, Sepsis. Die Struma zeigt gleichmäßig kolloidalen Inhalt mit eingesprengten, graugelben, weichen Massen.

Gewicht: 330,0 g.
Wassergehalt: 77,0334 %.
Trockensubstanz: 22,9666 %.
Verarbeitetes Material: 75,7897 g = 0,0046 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0067 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0014 % SiO_2.

Die folgenden Analysen sind durchweg mit solchem Material ausgeführt, das in der Zürcher Chirurgischen Klinik operativ erhalten worden war. Leider war in einigen Fällen bei den mir zugesandten Drüsen das Gewicht derselben gleich nach der Exstirpation nicht festgestellt. Ich muß mich bei ihnen auf die Angabe der Kieselsäurewerte in der Trockensubstanz beschränken.

20.

Sammelanalyse. Herkunft: 20jähriges Mädchen. — Stücke einer vor 12 Jahren operierten, jetzt rezidivierten Struma. — 16jähriger Mann. — 32jährige Frau. — 28jährige Frau, 85 g, in der Drüse mehrfach kleine harte, weiße Herde.

Verarbeitetes Material: 29,6223 g = 0,0235 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0794 % SiO_2.

21.

Struma rundlich, glatt. Beim Aufschneiden entleert sich aus einer geräumigen Cyste eine dünne, braunrote Flüssigkeit, die mit analysiert wurde. Struktur der Struma im übrigen derb, vereinzelte kleinere Hohlräume, schneidet sich schwer, stellenweise wie knorpelig. Die Struma wog hier nach dem Auspacken aus ihrer Umhüllung noch 149,53 g.

Verarbeitetes Material: 21,4813 g = 0,0104 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0484 % SiO_2.

22.

Struma rund, glatt, enthält eine große, mit blutigem Inhalt gefüllte Cyste. Inhalt mit analysiert. Hier wog die Struma noch 89,14 g.

Verarbeitetes Material: 13,6752 g = 0,0045 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0329 % SiO_2.

23.

15jähriger Knabe. Struma rund, glatt. Keine Cyste, gleichmäßig kolloidal.

Gewicht: 24,0 g.
Wassergehalt: 81,8898 %.
Trockensubstanz: 18,1102 %.

Verarbeitetes Material: 2,8270 g = 0,0012 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0424 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0050 % SiO_2.

24.

39 jährige Frau. Struma mit gleichmäßig weißgelbem Inhalt gefüllt, keine Cyste, schneidet sich schwerer wie die Greifswalder Drüsen.
Gewicht: 70,0 g.
Wassergehalt: 90,5040 %.
Trockensubstanz: 9,4960 %.
Verarbeitetes Material: 6,6476 g = 0,0027 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0406 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0038 % SiO_2.

25.

15 jähriger Knabe. Struma rund, glatt, sehr dünnwandig, besteht scheinbar aus einer einzigen Cyste, Inhalt braunrote Flüssigkeit, gerinnt beim Erwärmen. Wird, wie vor- und nachher, mit analysiert.
Gewicht: 87,0 g.
Wassergehalt: 92,0559 %.
Trockensubstanz: 7,9441 %.
Verarbeitetes Material: 6,9114 g = 0,0034 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0492 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0039 % SiO_2.

26.

28 jähriges Mädchen. Die Wand der Struma derb, schwer zu zerschneiden. Inhalt weißlich gelbe Massen, von derben Strängen durchzogen.
Gewicht: 94,0 g.
Wassergehalt: 88,4354 %.
Trockensubstanz: 11,5646 %.
Verarbeitetes Material: 10,8707 g = 0,0046 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0423 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0048 % SiO_2.

27.

17 jähriger Mann. Die Struma besteht größtenteils aus homogener, speckiger Masse. Drei kleine Cysten mit braunem, flüssigem Inhalt. Die Substanz der Struma kracht stellenweise unter der Schere beim Zerschneiden. An einer Stelle ein bohnengroßes, weißes Konkrement, das sich nicht zerschneiden läßt. Die Drüse wog hier noch 103,29 g.
Verarbeitetes Material: 27,4800 g = 0,0056 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0204 % SiO_2.

28.

31 jähriger Mann. In der Struma eine große Cyste mit rotbraunem, etwas krümeligem Inhalt. In der Wandung weißliche, kleine Konkremente.

Gewicht: 62,0 g.
Wassergehalt: 83,7611 %.
Trockensubstanz: 16,2389 %.
Verarbeitetes Material: 10,0681 g = 0,0091 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0904 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0147 % SiO_2.

29.

40jähriger Mann. In der Struma eine große Cyste mit gelblich weißem, schmierigem Inhalt.
Gewicht: 80,0 g.
Wassergehalt: 84,2661 %.
Trockensubstanz: 15,7339 %.
Verarbeitetes Material: 12,5871 g = 0,0078 g SiO_2.
Die Trockensubstanz enthält: 0,0620 % SiO_2.
Die frische Substanz enthält: 0,0097 % SiO_2.

Das Gesamtergebnis aus den vorstehenden Analysen stellt sich hinsichtlich des Gehaltes an Trockensubstanz für die verschiedenen Kategorien der Schilddrüsen so:

Das normale Greifswalder Material ergab als niedrigsten Wert für die Trockensubstanz: 20,6695 %, als höchsten: 28,1609 %. Im Mittel: 23,9777 %.

Die aus der hiesigen Chirurgischen Klinik und dem Pathologischen Institut erhaltenen Kröpfe ergaben als niedrigsten Trockengehalt: 18,1397 %, als höchsten: 28,8672 %. Der Mittelwert aus allen Analysen beträgt: 24,3304 %.

Es besteht mithin kein wesentlicher Unterschied im Trockengehalt des normalen und pathologischen Materials.

Wesentlich anders gestalten sich die entsprechenden Zahlen bei dem aus Zürich erhaltenen Material. Hier beträgt der niedrigste Wert: 9,4960 %, der höchste: 22,9666 %. Der Mittelwert stellt sich auf: 13,8703 %.

Die erhebliche Differenz gegenüber dem pommerschen Material erklärt sich einfach durch den wesentlich verschiedenen Aufbau der pommerschen und schweizer Strumen. Diese waren, wie sich aus den Analysen ergibt, zur Hälfte cystisch degeneriert und besaßen infolgedessen einen viel höheren Wassergehalt, wie das aus Pommern stammende Material.

Zur bequemeren Übersicht der für die Kieselsäurewerte erhaltenen Zahlen habe ich diese in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt. Die Tabelle ist so geordnet, daß die Werte

für Greifswalder normales und pathologisches Material gesondert aufgeführt wurden, daneben dann die Werte für die Züricher Strumen. Die Reihenfolge der Zahlen ist nach steigenden Werten geordnet, die nebenstehenden Nummern weisen auf die einzelnen Analysen hin. Sämtliche Werte entsprechen dem prozentualen Gehalt der Trockensubstanz an Kieselsäure.

Tabelle.

Greifswald				Zürich	
Nr.	normal	Nr.	pathologisch	Nr.	pathologisch
8	0,0029	10	0,0028	18	0,0065
1	0,0052	12	0,0084	19	0,0067
5	0,0066	11	0,0092	27	0,0204
4	0,0072	14	0,0146	22	0,0329
3	0,0076	9	0,0156	24	0,0406
7	0,0078	13	0,0201	26	0,0423
2	0,0124	17	0,0217	23	0,0424
6	0,0178	16	0,0276	21	0,0484
		15	0,0379	25	0,0492
				29	0,0620
				20	0,0794
				28	0,0904
	Mittelwert: 0,0675:8 = **0,0084**		Mittelwert: 0,1579:9 = **0,0175**		Mittelwert: 0,5212:12 = **0,0434**

Schon auf den ersten Blick ergeben sich beim Vergleich der einzelnen Zahlenreihen untereinander deutlich in die Augen springende Verschiedenheiten. Sie werden noch prägnanter, wenn man bei den einzelnen Reihen die Grenzwerte betrachtet, vor allem aber, wenn man die Mittelwerte berechnet und diese nebeneinanderstellt.

Wie sich aus der ersten Reihe ergibt, stellt sich der niedrigste Wert für die Kieselsäure auf: 0,0029 %, der höchste auf: 0,0178 %. Das Mittel aus der ersten Reihe beträgt: **0,0084 %**.

Die zweite Reihe, die die Zahlen enthält, die ich aus den Analysen aus norddeutschem Gebiet, wohl ausnahmslos aus Pommern herrührender Kröpfe, berechnet habe, ergibt als Minimalwert: 0,0028 %, als Maximum: 0,0379 %. Der Mittelwert aus der ganzen Reihe beläuft sich auf: **0,0175 %**.

Die dritte Reihe, lediglich aus Zürich bezogenes Kropfmaterial betreffend, ergibt als Minimum: 0,0065 %, als

Maximum: 0,0904 %. Der Mittelwert beläuft sich hier auf: **0,0434 %**.

Es verhalten sich demnach die Mittelwerte aus den drei Reihen untereinander wie 1:2:5!

Vergleicht man bei dem pathologischen Material die Werte untereinander, die die nicht cystisch entarteten Kröpfe gegenüber den cystenhaltigen geliefert haben, so ergibt sich für diese das mittlere Verhältnis von 1:1,77.

Die nächste Aufgabe würde nun die sein, nach Gründen zu suchen, aus denen man diese Ergebnisse einigermaßen genügend erklären könnte. Ich will vorher noch bemerken, obwohl es sich eigentlich von selbst versteht, daß die von mir bisher gewonnenen Werte als absolute nicht angesprochen werden können. Ausgedehntere Untersuchungen werden sicherlich zu Verschiebungen in meinen Mittelwerten führen. Zunächst aber steht für unsere weitere Überlegung fest:

Normale Schilddrüsen enthalten weniger Kieselsäure, wie strumös entartete. Von diesen letzteren enthalten die aus der Schweiz stammenden Kröpfe erheblich mehr Kieselsäure, wie die aus Norddeutschland. Den höchsten mittleren Gehalt an Kieselsäure weisen die Cystenkröpfe auf.

Diese letzte Erscheinung erklärt sich verhältnismäßig einfach. Der Inhalt der Cysten besteht im wesentlichen aus zerfallenem organischem Material mit dessen Gehalt an unorganischen Bestandteilen. Was von diesen Dingen einigermaßen leicht diffusibel ist, kann im Laufe der Zeit in bestimmten Verhältnissen aus der Cyste heraus diffundieren und mit dem Säftestrom weiter geführt werden.

Die sehr schwer diffundierende, kolloidale Kieselsäure wird zum allergrößten Teile zurückbleiben und so eine einfache Anreicherung des Cysteninhaltes mit Kieselsäure eintreten, die dann bei der Analyse der gesamten Trockensubstanz der Struma zahlenmäßig in Erscheinung tritt.

Wie aber erklärt sich die viel bedeutsamere Tatsache, daß pathologische Schilddrüsen in weitaus der größten Mehrzahl der Fälle mehr Kieselsäure aufweisen, wie gesunde?

Der nächstliegende Gedanke war natürlich der, daß ein abnorm starker Kieselsäuregehalt der Nahrung der Patienten, insbesondere des Trinkwassers, in Frage kommen könnte. Die

weitgehende Abhängigkeit des Auftretens von Kröpfen in gewissen Gegenden Deutschlands und der Schweiz vom Trinkwasser bezweifelt wohl niemand mehr.

Um so unsicherer ist dafür bis heute noch der Grund und die Erklärung für diese Erscheinung. Man hat den verschiedenen mineralischen Substanzon, die im Trinkwasser sich gelöst vorfinden, die Schuld zugeschoben, durch ihren fortgesetzten Genuß bei Menschen und Tieren Kröpfe auftreten zu lassen. Unendlich viele und mühevolle Untersuchungen sind durchgeführt worden, um der Sache auf den Grund zu kommen. Man hat auf das Sorgfältigste die geologischen Verhältnisse studiert, die für endemisch mit Kropf behaftete Gegenden in Frage kommen.

Ich will hier nur einige von den neueren Arbeiten dieser Richtung erwähnen. In erster Linie sind da zu nennen die beiden Schweizer, Bircher, Vater und Sohn. Als Schlußergebnis ihrer reichen Forschungen und Studien über die für die Schweiz maßgebenden Verhältnisse hat E. Bircher[1]) den Satz aufgestellt:

„Das kropferzeugende Agens ist präformiert im Wasser. Tritt dieses Wasser durch gewisse Schichten der Molasse oder der Trias, so lassen diese das Kropfagens glatt durchgehen. Oder aber das Wasser läuft durch Süßwasser oder terrestrische Gesteinsbildungen, und in diesen wird es nun an die Gesteine gebunden, das heißt, das Wasser wird nicht mehr kropferregend."

E. Hesse[2]), der sich das Studium der Verbreitung des Kropfes im Königreich Sachsen zur Aufgabe gestellt hat, kommt zu Schlüssen, die in bezug auf die geologischen Bedingungen nur zum Teil mit den von Bircher vertretenen Anschauungen übereinstimmen. Die Erfahrungen, die Hesse machte, lieferten hinsichtlich des reichlichen Vorkommens von Kröpfen im Kambrium mit Birchers Befunden übereinstimmende Resultate. Im Gegensatz dazu fand aber Hesse auf eruptivem Muskovitgneis und auf dem Eibenstocker Granit prozentual die meisten Kröpfe und, ebenfalls im Gegensatz zu Bircher, die paläozoischen Sedimentgesteine des Silurs, Devons und Carbons außerordentlich kropfarm. Hesse zieht aus seinen Studien das Fazit:

„Wahrscheinlich wird man annehmen dürfen, daß es eine völlig einheitliche Ursache für den endemischen Kropf nicht gibt, daß eine Anzahl verschiedener Noxen in Frage kommen können, unter denen mechanische Reize wohl auch nicht auszuschalten sind."

---

[1]) Zur Frage der Kropfätiologie. Deutsche med. Wochenschr. **1910**, 1705.

[2]) Die Verbreitung des Kropfes im Königreich Sachsen mit besonderer Berücksichtigung der geologischen Verhältnisse. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **102**, 217, 1911.

Fjellander[1]), der den endemischen Kropf im Husbydistrikt der schwedischen Provinz Dalarne studierte, fand über 25% der dortigen Bevölkerung mit Struma behaftet. Die geologischen Verhältnisse des von ihm durchforschten Reviers stützen wieder die von Bircher aufgestellten Anschauungen. Marine Ablagerungen, speziell der paläozoischen Epochen, sowie der Trias und des Tertiärs bilden den besten Boden für die Entwicklung des endemischen Kropfes.

Die neueste Arbeit über die Beziehungen zwischen dem Vorkommen des Kropfes und den geologischen Verhältnissen ist die von Lobenhoffer[2]) über die Verbreitung des Kropfes in Unterfranken. Er fand etwas Bemerkenswertes bei seinen sehr ausgiebigen Studien. In den Gegenden, die dem Buntsandstein und dem Muschelkalk angehören, sind die Randpartien der Reviere ausgiebiger vom Kropf heimgesucht, wie die zentraler gelegenen Orte. Lobenhoffer äußert sich zu diesem Befund:

„Den Grund dafür glaube ich darin erblicken zu dürfen, daß die Randabhänge den verwitternden Einflüssen der Atmosphäre viel mehr ausgesetzt sind, als die zentralen Teile. Dadurch wird das Gestein mehr aufgeschlossen und das Wasser führt deshalb mehr Kropfgift."

Die Tatsache, daß geologische Verhältnisse, das ihnen entstammende Trinkwasser und endemischer Kropf in enger Beziehung zueinander stehen, hat dann weiter dahin geführt, zu untersuchen, welcher Bestandteil des Trinkwassers oder welche besondere Eigenschaft desselben als letzte Ursache für seine kropferzeugende Fähigkeit angesprochen werden könne. Der ältere Bircher nahm einen, allerdings noch unbekannten, Erreger organischer Natur als im kropferzeugenden Wasser vorhanden und wirkend an. Ebbell[3]) glaubte, die radioaktive Eigenschaft von Boden und Wasser der Kropfgegenden als ursächliches Moment ansprechen zu dürfen. Besonders eingehend ist die ganze Frage in den letzten Jahren von M. Wilms und E. Bircher durchgearbeitet worden. Auf die von diesen beiden Forschern festgestellten Eigenschaften der sogenannten Kropfwässer möchte ich etwas näher eingehen.

Wilms[4]) nimmt direkt ein organisches Contagium in den Kropfwässern an. Er fand, daß das Wasser seine kropferzeugende Kraft einbüßt, wenn es gekocht wird. Bei seinen Versuchen, das Wasser durch Destillation im Vakuum möglichst zu entfernen und so vielleicht eine konzentriertere Lösung des schädlichen Agens zu erhalten, machte Wilms die Beobachtung, daß sich mit zunehmender Verminderung des Wassers reichliche Mengen unorganischer Salze ausschieden und dann das Wasser sich als nicht mehr kropferzeugend erwies. Dadurch kam

---

[1]) Endemische Struma im Husbydistrikt. Hygiea **1911**, Nr. 7. Ref. in Deutsch. med. Wochenschr. **1911**, 1713.

[2]) Die Verbreitung des Kropfes in Unterfranken. Mitteilungen aus den Grenzgebieten d. Med. u. Chirurg. **24**, 475, 1912.

[3]) Ätiologie der endemischen Struma. Norsk Mag. f. Laagevid. Nr. 11. Ref. in Deutsch. med. Wochenschr. **1910**, 2305.

[4]) Experimentelle Erzeugung und Ursache des Kropfes. Deutsche med. Wochenschr. **1910**, Nr. 13.

er zu der Annahme, daß bei der Ausscheidung der unorganischen Bestandteile gleichzeitig das organische Agens mit niedergerissen und so dem Wasser entzogen würde.

Besonders gründlich hat sich dann E. Bircher[1]) mit dem Studium der Kropfwässer beschäftigt. Ich lasse die wesentlichen Ergebnisse seiner Arbeit hier folgen:

Weiter Transport des Wassers und das längere Stehenlassen scheint dessen Infektionskraft herabzusetzen. Erhitztes Kropfwasser ist wirkungslos.

Letzterer Befund deckt sich mit den Angaben von Wilms. Der Umstand, daß das Kochen des Wassers und das längere Stehenlassen desselben als ungünstige Momente für seine kropferzeugende Wirkung sich erweisen, sind es auch gewesen, die Ebbell zu seiner vorher angeführten Ansicht von der Bedeutung der radioaktiven Eigenschaft des Wassers kommen ließen. Auch er fand, daß die strumabildende Eigenschaft des Wassers in Kropfgegenden nach längerem Laufe an der Luft oder in einer Leitung verloren geht und durch Kochen ebenfalls zerstört wird.

Durch Tränken von Tieren mit dem Wasser kropfverdächtiger Quellen gelingt es, eine Vergrößerung der Schilddrüse, in vielen Fällen richtigen Kropf zu erzeugen.

Es eignen sich offenbar nicht alle Tierarten in gleicher Weise für diese Versuche. · Besonders gut gelingen sie bei Ratten, weniger gut, aber immer noch befriedigend reagieren Hunde. Herbivoren eignen sich nach Birchers Erfahrungen am wenigsten für die künstliche Erzeugung von Kröpfen.

Während das filtrierte Aarauer Kropfwasser bei Tieren Vergrößerung der Schilddrüse hervorrief, wurden die Tiere, die die Filterrückstände erhielten, nie strumös.

Offenbar muß es sich nach allem, was bisher bekannt geworden ist, um ein im Trinkwasser gelöstes Agens handeln, das durch Filtrieren, selbst, wie sich ergeben hat, unter Anwendung von Kerzenfiltern, sich dem Wasser nicht entziehen läßt. Bircher folgert aus seinen Befunden, daß es sich um ein Toxin handelt, wie es nach den weiteren Untersuchungen scheint, von kolloidaler Beschaffenheit.

Die neueste Bestätigung der bisherigen Befunde bringt B. Breitner[2]) in seiner Abhandlung: „Über Ursache und Wesen des Kropfes". Mit absoluter Sicherheit konnte er bei 9 Personen eine unmittelbare Abhängigkeit der Zunahme der Schilddrüse von dem Genuß des Wassers eines bestimmten Brunnens dartun. Breitner nimmt an, daß die mit dem Trinkwasser eingeführte Noxe „den Stoffwechsel des Organismus, dadurch die Sekretproduktion der Schilddrüse und auf diesem Wege tertiär das sezernierende Epithel zu beeinflussen imstande ist".

---

[1]) Zur experimentellen Erzeugung der Struma, zugleich ein Beitrag zu deren Histogenese. Deutsche Zeitschr. f. Chir. **103**, 276, 1910.

[2]) Wiener klin. Wochenschr. **1912**, 82.

Kurz zusammengefaßt liegt die Frage nach der Ursache der kropferzeugenden Eigenschaft gewisser Quellen und Brunnen nach den bisherigen Befunden zurzeit so:

Die geologische Beschaffenheit des Bodens, dem das Wasser entstammt, ist von Bedeutung. Das kropferregende, im Wasser vorhandene Agens geht durch das Filter, wird beim Kochen, aber auch schon bei längerem Stehen des Wassers unwirksam, scheint sich wie ein Kolloid zu verhalten und legt die Vermutung nahe, daß es organischer Natur sei. Allerdings könnte es sich immer noch um eine unorganische, in dem Wasser gelöste Substanz handeln, die bisher der Untersuchung entgangen ist. Schon Kolle[1]) hat im Jahre 1909 auf diese Möglichkeit hingewiesen. In seiner Abhandlung „Über Ziele, Wege und Probleme der Erforschung des endemischen Kropfes" stellt er als Kernfrage des ganzen Problems den Satz auf:

„Ist es eine in Wasser suspendierte oder gelöste chemische Substanz, die bei der Entstehung des Kropfes, sei es direkt, sei es indirekt, beteiligt ist, — oder aber ist das Wasser Träger eines lebenden Virus, das seinerseits direkt oder indirekt zur Vergrößerung der Schilddrüse führt?"

Überlegt man die Bedeutung der geologischen Verhältnisse in den von Kropf heimgesuchten Gegenden, berücksichtigt man meine analytischen Befunde und bedenkt das eigenartige Verhalten der Kieselsäure in ihren Lösungen, so kann man schon auf den Gedanken kommen, daß diese Säure als ursächliches Moment vielleicht in Frage zu ziehen sei. Wiederholt habe ich mich davon überzeugen können, daß, wenn man Trinkwasser kocht, das einen geringen Anteil an Eisenoxydul führt, wie das in so vielen Trinkwässern der Fall ist, mit zunehmendem Entweichen der ursprünglich im Wasser vorhandenen Kohlensäure eine Ausflockung eintritt, die neben dem sich ausscheidenden Eisenoxyd Kieselsäure enthält. Dieselbe Erscheinung tritt auf, wenn man das Wasser längere Zeit an der Luft stehen läßt. Durch Abfiltrieren des entstandenen Niederschlages wird selbstverständlich die mit dem Eisen ausgeschiedene Kieselsäure dem Filtrat entzogen. Ich möchte zur Illustration des Gesagten einen derartigen Versuch schildern:

---

[1]) Schweiz. Korrespond.-Blatt **39**, Nr. 17, 1909.

1 l hiesigen Leitungswassers enthält 0,0172 g Kieselsäure als SiO_2 berechnet. Zu 1 l Wasser wurden zugesetzt 10 ccm einer Kieselsäurelösung mit dem bekannten Gehalt von 0,0445°/₀ SiO_2. Mithin betrug jetzt der Gesamtgehalt des Wassers an Kieselsäure 0,0216 g. Es wurde nun das Wasser in einem Glaskolben 6 Stunden lang auf dem Wasserbade digeriert. Dabei schied sich ein braunflockiger Niederschlag aus. Er wurde abfiltriert und nun der Kieselsäuregehalt des Filtrates und des Niederschlages getrennt für sich bestimmt. Das Filtrat enthielt 0,0157 g SiO_2.

Der auf dem Filter zurückgebliebene Niederschlag ergab einen Gehalt von: 0,0055 g SiO_2.

Mithin betrug der gesamte Kieselsäuregehalt dieses Ansatzes 0,0212 g gegenüber der ersten Bestimmung, die als Gesamtgehalt des Wassers 0,0216 g ergeben hatte. Die Differenz beträgt nur 0,4 mg. Berücksichtigt man den Kieselsäuregehalt des Filtrates gegenüber dem des Niederschlages, so findet sich, daß durch das Digerieren des Wassers und das Ausscheiden eisenhaltigen Niederschlages (der Eisengehalt wurde qualitativ festgestellt) rund 26°/₀ Kieselsäure der ursprünglichen Lösung entzogen worden waren.

Mehrfache Wiederholungen dieses Versuches unter verschieden gestellten Bedingungen ergaben im wesentlichen immer das gleiche Resultat: Durch Kochen und auch durch langes Stehenlassen an der Luft scheidet sich mit dem ursprünglich vorhandenen Eisen Kieselsäure aus und geht damit für das Filtrat verloren. Mithin ist anzunehmen, daß dieses hinsichtlich seiner etwaigen Kieselsäurewirkung herabgemindert wird. Dann fand ich noch eine interessante Mitteilung von Bircher. Ihm war das reichliche Vorhandensein von Diatomeen in den Kropfwasser liefernden Brunnen aufgefallen. Diese Lebewesen mußten also für die Bildung ihrer fast ganz aus Kieselsäure bestehenden Leibeshülle günstige Bedingungen in dem Wasser vorfinden.

Die, wie man leicht verstehen wird, ziemlich hochgespannte Erwartung, daß der Kieselsäuregehalt des Wassers als ein ursächliches Moment für die Genese des Kropfes angesprochen werden dürfte, hat sich schließlich als irrig erwiesen!

Ich hatte inzwischen damit angefangen, Ratten mit kieselsäurehaltigem Wasser zu füttern. Das Wasser enthielt zuerst

0,03, später 0,04 °/₀ gelöste Kieselsäure. Während der Fütterungsperiode erhielt ich dann von zwei verschiedenen Seiten her Wasser aus Aarau von einem der dortigen Kropfbrunnen. Die eine Sendung ergab bei der Bestimmung der Kieselsäure in zwei, gut miteinander stimmenden Analysen den Wert von 0,0079 g im Liter. Die andere Sendung ergab, ebenfalls in zwei gut stimmenden Analysen, 0,0053 g SiO_2 im Liter. Vergleicht man diese Werte mit dem Kieselsäuregehalt des hiesigen Trinkwassers aus der städtischen Wasserleitung gleich 0,0172 g im Liter, so ergibt sich schon eine sehr wenig erfreuliche Perspektive für die vermutete Bedeutung der Kieselsäure als eines genetischen Momentes für die Entstehung des Kropfes. Denn das hiesige Leitungswasser kommt als „Kropfwasser" nicht in Betracht. Ebenso resultatlos sind, um es kurz zu machen, die Fütterungsversuche, die über ein Vierteljahr ausgedehnt wurden, ausgefallen. In keinem einzigen Falle habe ich bei den während der Versuchszeit und zu ihrem Ende untersuchten Tieren irgendeine Veränderung an der Thyreoidea wahrnehmen können, die als Vergrößerung des Organes anzusprechen gewesen wäre.

Nach allem kommt also bei der Umschau nach den letzten Ursachen für das Auftreten des endemischen Kropfes die Kieselsäure nicht in Betracht.

Ich habe wiederholt darauf hingewiesen, daß junges Bindegewebe kieselsäurereicher ist, wie altes. Es ist daran zu denken, ob nicht das Bindegewebe des wachsenden und ausgebildeten Kropfes sich anders verhält wie das des übrigen Organismus, mit anderen Worten, allgemein als junges, unfertiges Gewebe angesprochen werden darf. Gesetzt, es wäre der Fall, so würden wir zwar eine Erklärung dafür haben, weshalb kropfig degenerierte Schilddrüsen an und für sich mehr Kieselsäure liefern, wie normale. Aber der höchst auffallende Unterschied, der besteht im Kieselsäuregehalt der aus Norddeutschland stammenden Strumen gegenüber den aus der Schweiz herrührenden, würde dadurch auch nicht aufgeklärt werden.

Die neu erschienene Monographie von A. Schittenhelm und W. Weichardt über den endemischen Kropf ist mir erst nach Erledigung der Korrektur zugegangen, so daß sie im Texte nicht mehr berücksichtigt werden konnte.

Natürliches und künstliches Komplement verhalten sich in bezug auf „Regeneration" identisch.

Von

B. v. Fenyvessy.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 12. September 1912.)

Durch eine in Bd. 43, Heft 5/6 dieser Zeitschrift erschienene Mitteilung von M. Gramenitzky bin ich gezwungen, auf dieses Thema nochmals zurückzukommen.

Um den gegenwärtigen Stand der Frage ins richtige Licht zu stellen, will ich an folgendes erinnern.

In Bd. 38, Heft 5/6 dieser Zeitschrift hat M. Gramenitzky die Angabe gemacht, daß die von ihm an natürlichen Seris beobachtete und als Regeneration des Komplementes bezeichnete Erscheinung an Seifen-Eiweißgemischen nicht wiedergefunden werden könne. Durch Hitze inaktiviert bzw. abgeschwächt, soll ihre Wirksamkeit nach längerem Stehen — im Gegensatz zu dem natürlichen Komplement — nicht mehr wiederkehren, sondern in manchen Fällen sogar noch weiter abnehmen.

Ich habe dann nachgewiesen (in Bd. 40, Heft 3/4 dieser Zeitschrift), daß diese Angabe unrichtig ist, und gezeigt, daß das künstliche Komplement, wenn es nur richtig, d. h. nach den von Liebermann und mir wiederholt gegebenen Vorschriften hergestellt wird, seine durch Erhitzen abgeschwächte hämolytische Wirkung nach einiger Zeit zurückerhält.

In seiner jüngsten, eingangs zitierten Abhandlung hat auch Gramenitzky die Richtigkeit dieser meiner und somit die Unrichtigkeit seiner eigenen, entgegengesetzten Angaben zugegeben.

Nun wendet aber Gramenitzky weiter ein, daß die von mir beobachtete Erscheinung der Regeneration natürlicher Komplemente doch nicht gleichzustellen ist, und zwar aus dem Grunde nicht, weil das künstliche Gemisch — auch wenn es vorher nicht erhitzt war — mit der Zeit an hämolytischer Wirkung spontan zunimmt.

Hierauf habe ich folgendes zu erwidern:

Trotz langjähriger, sehr eingehender Beschäftigung mit Seifen-Eiweißgemischen konnten wir eine spontane Erhöhung ihrer Wirksamkeit niemals beobachten. Hingegen ist die spontane Abschwächung von Seifenlösungen allgemein bekannt. Wenn uns die Befunde von Gramenitzky schon aus diesem Grunde auffällig erscheinen mußten, so konnte ich mich

durch eine Reihe direkt auf diese Frage hinzielender Versuche davon überzeugen, daß der erwähnte Einwand für unsere Gemische keine Geltung hat. Im folgenden teile ich einige Versuche mit, die an zwei verschiedenen, von uns angegebenen Kombinationen ausgeführt wurden. Die eine enthielt neben Seife und Eiweiß Ölsäure, die andere anstatt Ölsäure Borsäure[1]), und zwar in folgenden Verhältnissen:

I. 10 ccm 0,1%iger Seifenlösung (Natr. olein. Merck) + 5 ccm gesättigter Serumeiweißlösung (Merck) + 8 ccm Ölsäureemulsion + 7 ccm physiol. Kochsalzlösung.

II. Seife und Eiweiß wie oben + 5 ccm 1%iger Borsäurelösung + 10 ccm Kochsalzlösung.

Zu den (bei 37° ausgeführten) Versuchen wurden je 1,5 ccm des Gemisches und je 1,0 ccm 5%iger Rinderblutemulsion verwendet.

	Ölsäurehaltige Kombination	Borsäurehaltige Kombination
	Vollständige Hämolyse nach	
Gleich nach der Herstellung	30 Min.	32 Min.
Nach 3 Stunden	31 „	31 „
„ 6 „	30 „	33 „
„ 10 „	33 „	36 „
„ 24 „	31 „	35 „

Nach 3 Tagen vollkommen unwirksam. (3stündiger Versuch.)

Ein Teil der obigen ölsäurehaltigen Mischung wurde kurz nach der Herstellung 5 Minuten lang auf 56° erhitzt, sofort abgekühlt und unmittelbar nachher sowie nach 5 und 10stündigem Stehen untersucht.

	Vollständige Hämolyse nach
Nach dem Erkalten	66 Min.
„ 5stündigem Stehen . .	51 „
„ 10 „ „	50 „

Aus diesen Versuchen ist also ersichtlich, daß die hämolytische Wirkung unserer Gemische während der 24stündigen Beobachtung eine nennenswerte Änderung nicht erfahren hat, keinesfalls in der von Gramenitzky angegebenen Richtung; bei längerem Stehen werden sie aber (genau so wie das natürliche Komplement) spontan inaktiv. Diese Gemische (auf die sich unsere sämtlichen sonstigen Feststellungen beziehen, und die wir daher mit den natürlichen Komplementen in Analogie gebracht haben) zeigen auch jene Erscheinung, die Gramenitzky als Regeneration des Komplementes bezeichnet hat.

Damit ist aber die Unhaltbarkeit der gegen unsere Hypothese gerichteten Einwände Gramenitzkys von neuem erwiesen.

---

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung 2, Heft 4.

Zur Nomenklatur der Polyphenoloxydasen.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1912.)

Wir haben vorgeschlagen, die oxydierenden Fermente, die die Fähigkeit besitzen, die Polyphenole sowie deren entsprechende Aminokörper und die Jodwasserstoffsäure zu oxydieren, als Polyphenoloxydasen zu bezeichnen, eine Bezeichnung, die der Hauptfunktion des Fermentes, d. h. der Oxydationsbeschleunigung der Polyphenole und der entsprechenden Aminokörper entspricht[1]). Wir fügten hinzu, daß mehrere Monophenole nur schwierig oder vielleicht überhaupt nicht durch das die Polyphenole oxydierende Ferment oxydierbar sind. Wir haben uns auf die Untersuchungen von Bertrand gestützt, der beobachtet hatte, daß die Laccase die Polyphenole und die entsprechenden Aminokörper oxydiert, hingegen aber die Monophenole und deren Derivate fast nicht oxydiert. Bourquelot hatte hingegen bemerkt, daß die Laccase auch die Fähigkeit besitzt, Homologe der Phenole zu oxydieren, wie z. B. die Kresole, Xylenole und die entsprechenden Aminokörper, wie Anilin und Toluidin. Aber zur Zeit, wo Bourquelot diese Versuche ausführte, war der Unterschied zwischen der Tyrosinoxydase und der Laccase noch nicht festgestellt, so daß die von Bourquelot beobachtete Oxydation der Phenolderivate der Wirkung der Tyrosinoxydase zugeschrieben werden konnte.

In einer jüngst erschienenen Arbeit machen Bach und Maryanowitsch[2]) die Beobachtung, daß die gereinigte Pheno-

---

[1]) Battelli und Stern, Die Oxydationsfermente. Ergebnisse d. Physiol. 12, 96, 1912.

[2]) Bach und Maryanowitsch, Zur Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung. Diese Zeitschr. 42, 417, 1912.

lase (Polyphenoloxydase), sowie die Peroxydase + H_2O_2 die Monophenole und die Monoamine ebensogut wie die Polyphenole und die Polyamine oxydieren. Diese Verfasser sind der Ansicht, daß die Bezeichnung Polyphenoloxydase, die die Existenz einer Monophenoloxydase vermuten läßt, keine Berechtigung hat.

Wir halten es jedoch für opportun, die Bezeichnung Polyphenoloxydase aufrechtzuhalten. In ihrer Arbeit geben Bach und Maryanowitsch keine quantitativen Resultate. Wir glauben nicht, daß die Beobachtung von Bertrand, wonach die Polyphenole und deren Derivate viel leichter als die Monophenole und deren Derivate oxydiert werden, als hinfällig betrachtet werden kann. Übrigens gehören die klassischen Oxydasereagenzien zu den Polyphenolen oder den entsprechenden Aminokörpern (mit Ausnahme des Jodwasserstoffes, der hier nicht in Betracht kommt).

Andererseits oxydiert die Tyrosinoxydase Monophenole; sie wäre demnach auch als eine Phenoloxydase zu bezeichnen. Doch oxydiert die Tyrosinoxydase weder die Polyphenole, noch die Polyamine. Wenn man also die Bezeichnung Polyphenoloxydase gebraucht, schließt man die Tyrosinoxydase aus, was nicht der Fall wäre, wenn man die Bezeichnung Phenoloxydase beibehält.

Jedenfalls muß die Bezeichnung Phenolase fallen gelassen werden, da diese Bezeichnung vermuten lassen könnte, daß es sich um ein hydrolytisches Ferment handle. So bezeichnet z. B. Terroine[1]) als Phenolasen die Fermente, die die aromatischen Äther spalten.

Wir halten es also für zweckmäßig, als Polyphenoloxydase das Ferment zu bezeichnen, das hauptsächlich die Polyphenole und die Polyamine oxydiert.

Will man jedoch die Bezeichnung Polyphenoloxydase nicht beibehalten, so müßte man jedenfalls Phenoloxydase an Stelle von Phenolase gebrauchen, da die letztere Bezeichnung zu Verwirrungen Anlaß geben könnte, weil sie nicht angibt, daß es sich um ein oxydierendes Ferment handelt.

---

[1]) Terroine, Le suc pancréatique contient-il un ou plusieurs ferments saponifiants? Journ. d. Physiol. et Pathol. génér. **1911**, 857.

Spaltung von α- und β-Methylglucosid durch Aspergillus niger.

Von

Arthur W. Dox und Ray E. Neidig.

(Aus der chemischen Abteilung der Agrikultur-Versuchsstation zu Iowa.)

(Eingegangen am 5. September 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Über das Verhalten der beiden stereoisomeren Methylglucoside gegen hydrolysierende Agenzien sind eine Reihe von Unterschieden bekannt. Nach Armstrong[1]) wird die β-Verbindung durch Säuren 1,79 mal so schnell zerlegt als die entsprechende α-Verbindung. Noch ausgesprochener ist das unterschiedliche Verhalten zu Enzymen. Die Wirkung der Enzyme scheint in diesem Falle das Spezifische zu sein, indem zwei Fermente zur Spaltung der beiden Isomeren erforderlich sind. E. Fischer[2]) hat gezeigt, daß das α-Glucosid durch Hefe, das β-Glucosid durch Mandelemulsin zerlegt wird. Um keine neuen Namen für diese Fermente prägen zu müssen, läßt Fischer die Annahme zu, daß die Spaltung des α-Methylglucosids durch die Hefenmaltase besorgt werde und daß diejenige des β-Methylglucosids und der natürlichen Glucoside durch ein und dasselbe Ferment (Emulsin) zustande käme. Armstrong benutzte die spezifische Empfindlichkeit der α-Verbindung gegen Hefen zu einer Trennung von der β-Verbindung aus einem Gemisch der beiden Isomeren.

---

[1]) Armstrong, The Simple Carbohydrates and the Glucosides. 1910. S. 63.

[2]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 2407; 28, 984 u. 1429.

Ähnliche Unterschiede stellte Pottevin[1]) für die entsprechenden Methylgalactoside fest. In seinen Experimenten wurde keines von beiden Isomeren durch das Enzymgemisch aus Aspergillus niger angegriffen, wenn der Pilz auf Rohrzucker kultiviert war. Wenn aber eins der Isomeren in der Kulturflüssigkeit vorhanden war, so wurde ein spezifisch auf die angewandte Form eingestelltes Enzym gebildet. Er fand ferner, daß α-Methylglucosid partiell durch Aspergillus niger angegriffen wird. Er unterließ jedoch, die Wirkung des Aspergillusfermentes auf β-Methylglucosid zu prüfen. Es blieb also festzustellen, ob ein typischer Pilz, wie Aspergillus niger, eine ähnliche Spezifität den beiden Glucosiden gegenüber entfalte wie die Hefe.

Versuche.

Die beiden Methylglucoside wurden nach E. Fischers Angaben aus Traubenzucker und Methylalkohol dargestellt und durch fraktionierte Krystallisation getrennt. Die Darstellung der α-Verbindung geschah leicht, während sich die β-Verbindung nur langsam aus den Mutterlaugen abschied.

Zunächst wurde eine Reihe von Kulturversuchen angestellt, um die Brauchbarkeit der beiden Isomeren als Kohlenstoffquelle in folgender Nährflüssigkeit zu prüfen:

1000 ccm dest. Wasser
0,5 g $MgSO_4$
1,0 g $NH_4H_2PO_4$
0,5 g KCl
2,0 g NH_4NO_3
0,01 g $FeSO_4$
20,0 g α- oder β-Methylglucosid.

7 verschiedene Pilzkulturen wurden auf der erwähnten Lösung angesetzt. Die Wachstumsstärke eines jeden Organismus auf der α- oder β-Verbindung ist in folgender Tabelle wiedergegeben.

[1]) Pottevin, Annales de l'Inst. Pasteur 17, 31.

K	bedeutet	lediglich Keimung,
+	"	geringes Wachstum,
++	"	beträchtliches Wachstum,
+++	"	eine normale, gute Kultur.

Organismus	1 Woche alt auf		2 Wochen alt auf	
	α	β	α	β
A. niger	K	+++	+	+++
A. clavatus	+	+	++	+++
A. fumigatus	K	++	+	+++
Penicillium camemberti	K	++	++	+++
P. expansum	++	+++	+++	+++
P. chrysogenum	+	+++	+	+++
P. roqueforti	+	++	+	++
P. digitatum	K	+++	K	+++

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die geprüften Pilze auf der β-Verbindung weit reichlicher als auf der α-Verbindung gedeihen. In weiteren Versuchen mit Aspergillus niger wurde diese Wirkung der beiden Glucoside noch schärfer sichergestellt. Derselbe deutliche Unterschied in der Brauchbarkeit der beiden Substanzen als Kohlenstoffquellen trat bei anderen Nährflüssigkeiten zutage, wenn sie hier die gewöhnlichen Kohlenhydrate ersetzen. Wenn eine Kulturflüssigkeit als einzige Kohlenstoffquelle α-Methylglucosid enthielt, mit Sporen von Aspergillus niger geimpft wurde, so fand nur ein sehr mäßiges Wachstum des Pilzes statt. Selbst nach mehrwöchentlichem Warten war die Oberfläche nur unvollständig mit Mycel bedeckt und wies nur vereinzelte Kolonien auf. Hingegen liefert β-Methylglucosid ein dichtes Mycel, das die gesamte Oberfläche bedeckt.

Die Wirkung des lebenden Pilzorganismus auf die Glucoside kann leicht mit Hilfe des Polarisationsapparates verfolgt werden.

Eine Kulturflüssigkeit, die die gewöhnlichen Salze und ungefähr 2 % der Glucoside enthielt, wurde mit Aspergillus niger geimpft. Die Glucoside wurden nach Sterilisation der Flüssigkeit in aseptischem Zustand hinzugefügt, so daß eine molekulare Umlagerung durch Erhitzung im Autoklaven ausgeschlossen war. Das Drehungsvermögen ist jedesmal nach mehrtägiger Pause bestimmt worden.

Alter der Kultur Tage	Drehung mit α-Verbindung	Drehung mit β-Verbindung
0	+ 13,6	− 3,1
4	+ 13,3	− 2,0
9	+ 13,0	0,0
12	+ 12,7	0,0
19	+ 12,5	0,0

Die Wiederholung des Versuches ergab ähnliche Resultate.

Alter der Kultur Tage	Drehung mit α-Verbindung	Zerstörung %	Drehung mit β-Verbindung	Zerstörung %
0	+ 17,3	0,0	− 3,2	0,0
2	+ 17,3	0,0	− 2,2	31,2
4	+ 17,2	0,5	− 0,9	71,9
5	—	—	− 0,4	87,5
6	+ 17,1	1,2	0,0	100,0
8	+ 16,8	2,9	0,0	—
12	+ 16,5	4,6	0,0	—
16	+ 16,0	7,5	0,0	—
20	+ 15,9	8,2	0,0	—

Am Ende des 6. Tages war die β-Verbindung vollständig aufgezehrt, während die α-Verbindung zu weniger als 3% verbraucht war. Selbst nach 20 Tagen waren nur 8,2% der α-Verbindung zerstört. Niemals konnte mit Fehlingscher Lösung eine Reduktion erzielt werden; demnach wird der Traubenzucker verbraucht in dem Maße, wie er in Freiheit gesetzt wird. Nimmt man an, daß die Glucoside vor Eintritt der Assimilation enzymatisch aufgespalten werden, so muß das β-Enzym in beträchtlichem Überschusse über das α-Ferment vorhanden sein. Am besten werden die Ergebnisse graphisch durch nebenstehende Kurve (Fig. 1) wiedergegeben.

Um die Wirkung des im Mycel vorhandenen Fermentes festzustellen, wurde folgende Behandlung vorgenommen. Eine Aspergillus-niger-Kultur, die innerhalb einer Woche auf 25 ccm Nährflüssigkeit mit 2% der erwähnten zwei Kohlenstoffquellen gewachsen war, wurde sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen, zwischen Filtrierpapier getrocknet und mit Kieselgur verrieben. Diese Mischung wurde dann in ein Glasstöpselgefäß übergeführt, das genau 25 ccm destilliertes Wasser enthielt. Dann erfolgte Zusatz von 0,5 g des zu prüfenden Glucosids und

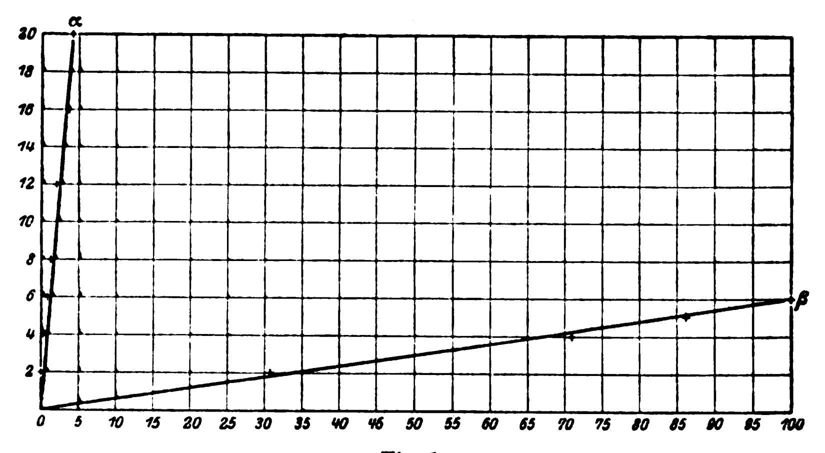


Fig. 1.
x-Achse = Alter der Kultur in Tagen.
y-Achse = Verschwundene Glucosidmenge in Prozenten.

2 ccm Chloroform als Antisepticum. Nach zweiwöchentlichem Stehen wurden die Gemische filtriert und das Filtrat in einem 2 dcm-Rohre polarisiert.

Kohlenstoffquelle	α-Verbindung Ablesung im Polarisationsapparat a) direkt	α-Verbindung Ablesung im Polarisationsapparat b) nach 2 Wochen	Hydrolyse %	β-Verbindung Ablesung im Polarisationsapparat a) direkt	β-Verbindung Ablesung im Polarisationsapparat b) nach 2 Wochen	Hydrolyse %
β-Methylglucosid . .	+ 17,3	+ 16,8	4,3	− 3,2	+ 3,0	74,7
Rohrzucker	+ 17,3	+ 16,7	5,2	− 3,2	+ 3,9	85,5
Maltose	+ 17,3	+ 17,0	2,6	—	—	—

Pottevin fand, daß Aspergillus niger nicht auf Galactosiden gedeihen wollte, wenn die Kultur nicht erst auf Rohrzucker gewachsen war, der dann durch Galactoside ersetzt werden konnte. Auf diesem Wege wurden die Galactoside reichlich ausgenutzt unter Bildung des entsprechenden Fermentes. Unsere Versuche zur Darstellung einer α-Glucosid-Fermentlösung waren erfolglos.

Nach 6 tägiger Kultur auf Rohrzucker hatte Aspergillus niger ein dichtes Mycel erzeugt und zeigte beginnende Sporenbildung. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt, das Mycel einige Zeit in sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und das ursprüngliche Volumen unter Zusatz von 2% α-Methylglucosid

wiederhergestellt. Eine Kultur diente zur Kontrolle, und der Rest wurde für weitere Kulturen zur Seite gestellt. Der Inhalt der Kontrollflasche wurde sofort filtriert, das Volumen auf 30 ccm gebracht und im 2 dcm-Rohre polarisiert. Die gleichen Bestimmungen wurden nach ein- bzw. zweiwöchentlicher Berührung von Mycel mit Glucosidlösung ausgeführt, wobei sich folgende Verhältnisse ergaben:

Wochen	Lebendes Mycel		Enzympräparat (aus Mycel nach 1 wöchentlicher Berührung mit α-Glucosid)	
	Drehung	Hydrolyse %	Drehung	Hydrolyse %
0	+ 13,3	—	—	—
1	+ 12,0	9,8	+ 17,3	—
2	+ 12,0	9,8	+ 16,4	7,8

Die Andeutung einer Anpassung des Pilzes an das neue Milieu ist gering, praktisch überhaupt nicht vorhanden. Die beachtenswerte Reaktion des Pilzorganismus auf die neue Umgebung, die Pottevin bei den Methylgalactosiden bemerkt hat, war in unseren Versuchen mit α-Methylglucosid nicht wahrnehmbar. Pottevin erzielte auch eine stärkere Hydrolyse von α-Methylglucosid als wir.

Das mag in der größeren, von ihm verwendeten Enzymkonzentration seinen Grund haben; wahrscheinlich wäre unter analogen Bedingungen auch der Umfang der β-Methylglucosidspaltung ein entsprechend größerer.

Das Hauptergebnis unserer Versuche ist die Feststellung, daß Aspergillus niger gegen die beiden isomeren Methylglucoside gerade umgekehrt reagiert wie Hefe. Aspergillus niger wirkt leicht auf die β- und kaum auf die α-Form, während Hefefermente nur α-, nicht aber β-Methylglucosid angreifen.

Neutralitätsregulation und Reizbarkeit des Atemzentrums in ihren Wirkungen auf die Kohlensäurespannung des Blutes.

Von

K. A. Hasselbalch.

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1912.)

Mit 8 Figuren im Text.

Im Jahre 1905 wurde von Haldane und Priestley[1]) die wegen ihrer Einfachheit so ansprechende und auch darum so fruchtbar gewordene Theorie aufgestellt, daß unter normalen Verhältnissen die Spannung der Blutkohlensäure als alleiniger chemischer Regulator der Lungenventilation des Menschen anzusehen sei.

Die Arbeit der späteren Jahre von sowohl englischer als auch deutscher, österreichischer, amerikanischer und dänischer Seite hat es indessen wahrscheinlich gemacht, daß die CO_2 des Blutes lediglich durch ihre Säurenatur diese regulatorische Wirksamkeit ausübt, und daß sie darum von anderen Säuren vertreten werden kann.

Boycott und Haldane[2]) nennen 1908 die „gesamte Acidität" des Blutes den eigentlichen chemischen Reiz für das Atemzentrum. Zuntz und Kollegen[3]) lassen bei Sauerstoffmangel die intermediären sauren Stoffwechselprodukte für einen Teil der Blutkohlensäure vikariieren; für Durig[4]) spielen im Hochgebirge die durch den Sauerstoffmangel herbeigeführten

1) Journ. of Physiol. 32, 1905.

2) Journ. of Physiol. 37, 369, 1908.

3) Höhenklima und Bergwanderungen, Berlin 1906, z. B. S. 327.

4) Ergebnisse der Monte-Rosa-Expedition XIII, Wien 1910, S. 76 [424] u. 90 [438].

Reize auf das Atemzentrum eine größere Rolle als die Kohlensäuretension des Blutes; bis endlich Winterstein[1]) als (soviel ich weiß) Erster die in quantitativer Weise formulierte, aber ihres Inhalts nach also schon längst aufgestellte Theorie ausspricht, daß nicht die CO_2-Spannung an und für sich, sondern die aktuelle Reaktion, die H-Ionenkonzentration des Blutes, den wahren Stimulus des „Atemzentrums" ausmacht, und zwar unter allen Umständen. Im folgenden wird diese Theorie kurz „Neutralitätstheorie" genannt.

Die ursprüngliche Annahme Haldanes verlangte, daß in der Ruhe das Individuum unwillkürlich sein Blut genau so stark — oder so schwach — ventilierte, daß die für dasselbe eigene CO_2-Spannung des Blutes innegehalten wurde.

Die Neutralitätstheorie fordert, daß durch Lunge und Nieren immer so viele H-Ionen ausgeschieden werden, daß das Blut eine gegebene H-Ionenkonzentration bewahrt.

Eine solche quantitative Prüfung der Theorie ist noch nicht vorgenommen worden, und zwar aus dem einfachen Grunde, weil man erst neuerdings über eine brauchbare Methode zur Bestimmmung der $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes bei gegebenem CO_2-Druck verfügt.

H. Benedicts[2]) Untersuchungen über den Hydroxylionengehalt des Diabetikerblutes haben den Verfasser zu der Ansicht geführt, daß die Reaktion des Diabetikerblutes sich von der des normalen Menschenblutes kaum unterscheidet. Die Messungen Benedicts sind aber an Serum, und zwar ohne Rücksicht auf CO_2-Verlust während der Gewinnung, außerdem mit einer Methode, die einen systematischen Fehler wegen CO_2-Verlustes während der Messung bedingt, vorgenommen worden. Das Resultat Benedicts ist deshalb nur ein Beweis für die Behauptung des Verfassers, daß das Coma diabeticum nicht als einfache Säurevergiftung erklärt werden kann (s. u.). Ohne Rücksicht auf die CO_2-Spannung des Blutes kann die hier gestellte Aufgabe nicht gelöst werden.

Barcroft[3]) hat gefunden, daß die Dissoziationskurve des Oxyhämoglobins, die (Bohr, Krogh und Hasselbalch[4]) bekanntlich von der CO_2-Spannung abhängig ist, sich im Hochgebirge (3300 m ü. d. M.) nicht ändert. Da ja die Spannung der Blutkohlensäure im Hochgebirge

[1]) Centralbl. f. Physiol. **24**, 811, 1910; Arch. f. d. ges. Physiol. **138**, 167, 1911.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **115**, 1906.

[3]) Journ. of Physiol. **42**, 1911.

[4]) Skand. Arch. f. Physiol. **16**.

gewöhnlich stark herabgesetzt ist, und zwar in Barcrofts Fällen genau um so viel, daß die Dissoziationskurve unverändert blieb, so könnte hieraus mit einiger Wahrscheinlichkeit auf unveränderte $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes geschlossen werden. Indessen influieren, wie Barcroft und Camis[1]) gefunden haben, außer CO_2 und anderen Säuren auch Salze auf die Dissoziationskurve des Oxyhämoglobins, so daß es sich um eine kombinierte Wirkung von herabgesetztem CO_2-Druck und abgeändertem Salzgehalt des Plasmas handeln könnte. — Barcroft bezweckt übrigens, soweit ich ersehen kann, mit diesen Untersuchungen gar keine Beweisführung für eine unveränderte $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes.

Die Versuche, die sonst in der Literatur vorliegen und die direkt zur Prüfung der „Neutralitätstheorie" angestellt worden sind, waren — das muß zugegeben werden — nur qualitativer Natur.

Wintersteins[2]) eigene Versuche, wo er neugeborene Warmblüter mit Lösungen berechenbarer H-Ionenkonzentrationen durchspült und die Atmungsbewegungen verzeichnet, beweisen eigentlich nur, daß Säuren (sowohl in als ohne Vorhandensein von Sauerstoff) das Atemzentrum inzitieren können. Schon aus den viel älteren Versuchen Walthers[3]), Lehmanns[4]) und Jaquets[5]), wo die Säuren in das Blut injiziert wurden, wußten wir ungefähr soviel. Kann man gegen die Beweiskraft der älteren Versuche anführen, daß aus dem Blut von der Säure CO_2 freigemacht worden ist, so kann in Wintersteins Versuchen die CO_2 aus den Geweben selbst von den Säuren freigemacht worden sein.

Sobald die Wintersteinsche Versuchsanordnung in quantitativer Weise dazu benutzt werden soll, über das wirksame Moment der Säureinjektion Aufschlüsse zu geben, erweist sie ihre fundamentalen Mängel. Wie Szili[6]) besonders schön bei seinen Säurevergiftungsversuchen gezeigt hat, ist die Injektion von irgendeiner Säure in die Blutbahn hinein ein sehr komplizierter Eingriff, wo man nicht nur mit der dosierten Konzentration von H-Ionen, sondern auch mit derjenigen der Anionen, der undissoziierten Moleküle und der gebildeten Salze zu rechnen hat. So ist es denn möglich gewesen, daß die Wintersteinsche Versuchsanordnung von Laqueur und Verzár[7]) dazu benutzt werden konnte, die darauf basierte Wintersteinsche Anschauung zu bestreiten. Laqueur und Verzár heben besonders hervor, daß die $C_{H^{\cdot}}$, bei den starken Säuren wie HCl auf das Atemzentrum erregend wirken, von einer weit höheren Größenordnung ist als die, bei der CO_2 erregend wirkt. Während nun die Verfasser aus ihren Versuchen mit Recht folgern, daß „es nicht angeht, alle Wirkungen von Säuren auf deren

---

1) Journ. of Physiol. **39**, 1909.
2) Arch. f. d. ges. Physiol. **138**, 1911.
3) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **7**, 1877.
4) Arch. f. d. ges. Physiol. **42**, 1888.
5) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **30**, 1892.
6) Arch. f. d. ges. Physiol. **130**, **1909**.
7) Arch. f. d. ges. Physiol. **143**, **1912**.

Säurenatur zurückzuführen, sondern daß sich oft im Gegenteil eine spezifische Wirkung des Säureanteils nachweisen läßt"[1]), schließen sie überraschenderweise: „Eine solche spezifische Wirkung hat auch die Kohlensäure."

Der letzte Satz ist unbewiesen. Mir scheint es mindestens ebenso wahrscheinlich, daß die Anionen der körperfremden Säuren eine schädigende, sagen wir: eine lähmende Wirkung auf das Atemzentrum entfaltet haben, so daß der Reiz der H-Ionen einen geringeren Effekt hervorgebracht hat, als es mit der Kohlensäure, deren Anionen die Reizbarkeit des Atemzentrums nicht beeinflussen, der Fall war. Mit anderen Worten: der Versuch kann anders gedeutet werden, als es die Verfasser meinen, oder er ist ungeeignet dazu, die Probleme zu klären, zu deren Lösung er angestellt war.

Brailsford Robertson[2]) hat aus seinen, 1908 veröffentlichten Versuchen (Unterbringung von gelösten Stoffen auf das verlängerte Mark des dezerebrierten Frosches) folgern können, daß „die Vorgänge, die im wesentlichen der Funktion der Nervenzellen [des Atemzentrums] zugrunde liegen, durch Säuren beschleunigt werden, während zu gleicher Zeit in den Nervenzellen eine oder mehrere Substanzen von saurem Charakter freigesetzt werden"[3]). Seine Ansichten stützen also im ganzen diejenigen Wintersteins, obschon sie nicht auf quantitativer Prüfung beruhen, so daß die Anschauung von Laqueur und Verzár von der Kohlensäure als spezifischem Reiz für das Atemzentrum durch die Robertsonschen Versuche nicht widerlegt worden ist, was der Verfasser auch eingesteht.

Endlich haben Hasselbalch und Lundsgaard[4]) die Änderungen der $C_H\cdot$ im arteriellen Blute des lebenden Versuchstieres gemessen, die durch die Atmung CO_2-haltiger Luftgemische bewirkt wurden, und gefunden, daß die Lungenventilation mit der $C_H\cdot$ parallel geht. Ob dabei die Vermehrung der CO_2-Spannung oder die der $C_H\cdot$ des Blutes als der wirksame Reiz anzusehen war, konnte bei der benutzten Versuchsanordnung nicht entschieden werden, obschon einige Versuche dafür sprachen, daß es eher die $C_H\cdot$ als die CO_2-Spannung an und für sich war.

Mit großer Klarheit ist Mathison[5]) für die Geltung der „Neutralitätstheorie" für zwei andere Gebiete der Physiologie, nämlich für die Wirksamkeit des vasomotorischen Zentrums und für die Reduktionsgeschwindigkeit des Oxyhämoglobins in einem indifferenten Luftstrom, eingetreten. Da Mathison wegen des Mangels einer brauchbaren Meßmethode die $C_H\cdot$ des Mediums nicht hat ausmessen, sondern nur schätzen können, steht aber auch für diese Funktionen der entscheidende Beweis für die Richtigkeit der Neutralitätstheorie aus.

---

[1]) l. c., S. 427.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **145**, 1912.

[3]) l. c., S. 333.

[4]) Skand. Arch. f. Physiol. **27**, 1912.

[5]) Journ. of Physiol. **42**, 1911; **43**, 1911.

Wenn man die bis jetzt noch unbewiesene „Neutralitätstheorie" als richtig voraussetzt, ist es naheliegend, in allen Fällen, wo die CO_2-Spannung des Blutes abnorm niedrig gefunden wird, auf eine vermehrte Produktion von intermediären sauren Stoffwechselprodukten zu schließen, weil sonst die C_H· des Blutes abnorm klein sein würde. Das ist eben die weitreichende Bedeutung der Theorie gewesen.

Eine solche Schlußfolgerung ist tatsächlich in großem Umfang gemacht worden, und zwar sowohl von seiten der Höhenklimaforscher (s. o.) wie auch im Interesse der menschlichen Pathologie.

Das unzureichende Sauerstoffangebot an die Gewebe (Höhenklima, Herzkrankheiten, langdauernde und anstrengende Muskelarbeit) oder der abnorme Verlauf der Stoffwechselvorgänge (Diabetes, Urämie) sollte dann zu einer Produktion von abnormen, im Blute zirkulierenden Stoffen sauren Charakters führen, die im Interesse der gleichbleibenden C_H· des Blutes die CO_2-Spannung derselben herabdrücken sollten, und zwar durch vermehrte Atmungstätigkeit. Bei einigen dieser Zustände mit abnorm niedriger CO_2-Spannung ist bekanntlich der Nachweis solcher sauren Stoffwechselprodukte gelungen, in anderen Fällen nicht. Ich gehe übrigens auf diese Untersuchungen hier nicht ein, weil ich die obenerwähnte Schlußfolgerung, worauf sie basiert sind, als sehr angreifbar betrachte.

Die Annahme, daß bei abnorm niedriger CO_2-Spannung des Blutes eine abnorme Produktion intermediärer saurer Stoffwechselprodukte vorliegen muß, ist nämlich nur unter zwei Voraussetzungen berechtigt.

Die chemische Regulation der Atmung vollzieht sich vermittels: 1. eines Reizes, 2. einer nervösen Einrichtung, eines „Atemzentrums", worauf der Reiz einwirkt.

Demnach muß der Effekt, die Lungenventilation und damit die Spannung der Blutkohlensäure, 1. von der Größe des Reizes und 2. von der Reizbarkeit des Zentrums[1]) abhängen.

[1]) Lindhard (l. c., S. 339) hat auf die leider gar zu häufige Verwechslung der Begriffe Erregung und Erregbarkeit aufmerksam gemacht. Um dieser Verwechslung vorzubeugen, habe ich in dieser Abhandlung den Ausdruck Reizbarkeit = Erregbarkeit benutzt.

Nehmen wir vorläufig an, der **Reiz** sei die eine bestimmte Größe überschreitende $C_H\cdot$ des Blutes, und daß die **Reizbarkeit** des Atemzentrums eine Konstante ist.

Aus der Fig. 1, wo in einem Koordinatensystem die CO_2-Spannung des Blutes als Abszissen, die H-Ionenexponenten als Ordinaten eingetragen sind, ersieht man, was unter diesen Voraussetzungen mit der CO_2-Spannung des Blutes geschehen mußte, falls eine Person mit dem Blut *a* und der alveolaren CO_2-Spannung 40 mm ein (bei gegebener CO_2-Spannung) saureres Blut *b* bekäme und die für sie eigene $C_H\cdot$ des Blutes $10^{-7,20}$ innehalten sollte. Die CO_2-Spannung müßte durch eine stärkere Lungenventilation auf 35 mm heruntergebracht werden.

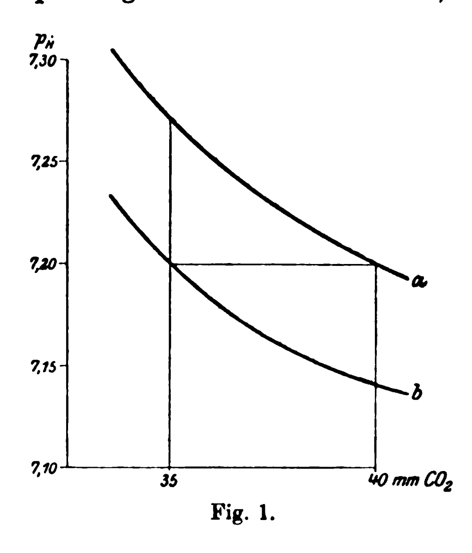


Fig. 1.

Unter den erwähnten zwei Voraussetzungen: 1. daß es die $C_H\cdot$ des Blutes ist, die in einer die Norm überschreitenden Größe das Atemzentrum zu verstärkter Tätigkeit inzitiert, und 2. daß die Reizbarkeit des Zentrums konstant bleibt, kann man von einer Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung von 40 mm bis auf 35 mm (Fig. 1) auf eine **saurer**[1]) gewordene Blutbeschaffenheit schließen und nach der Bestimmung der Kurven *a* und *b* sogar quantitativ die $C_H\cdot$ der hinzugekommenen sauren Verbindungen berechnen.

Ich füge hier noch hinzu, daß es sich gar nicht um **abnorme** saure Blutbestandteile zu handeln braucht. **Hasselbalch** und **Lundsgaard**[2]) haben gezeigt, daß (bei gleicher CO_2-Spannung) die Blutkörperchen saurer reagieren als das Gesamtblut. Es ist demnach möglich (s. auch Abschn. IV unten), daß das Blut im Fall *b* (Fig. 1) **einfach eine größere** Kon-

[1]) D. h. bei gegebener CO_2-Spannung von größerer $C_H\cdot$.

[2]) Diese Zeitschr. **38**, 1912.

zentration von Blutkörperchen (Hämoglobin?) gehabt hat als im Fall *a*, eine Betrachtung, die in der Physiologie des Sauerstoffmangels (Höhenklima) vielleicht von Bedeutung werden kann.

Nun ist aber die zweite Voraussetzung, unter der die Schlußfolgerung, daß bei einer alveolaren CO_2-Spannung von 35 mm das Blut saurer[1]) ist als bei einer von 40 mm (Fig. 1), die Voraussetzung nämlich von der individuellen Konstanz der Reizbarkeit des Atemzentrums, nicht nur unbewiesen, sondern sogar beweislich nicht zutreffend. Wie ich unten zeigen werde, ist die Reizbarkeit des Atemzentrums eine Größe, die zwar unter normalen Umständen für das Individuum recht konstant bleibt, die aber experimentell und von abnormen Umständen leicht beeinflußbar ist und z. B. [Lindhard[1])] umgekehrt wie die Sauerstoffspannung des Blutes variiert.

Wenn dem so ist, kann die erniedrigte CO_2-Spannung des Blutes (35 mm, s. Fig. 1) auf mehrere Weisen zustande gekommen sein. Ein sehr einfacher Mechanismus ist der folgende: Die Blutbeschaffenheit *a* ist gänzlich unverändert; da aber das Zentrum reizbarer als vorher geworden ist, reagiert es auf geringere chemische Reize, auf eine niedrigere $C_{H^\cdot}$ des Blutes ($p_{H^\cdot} = 7{,}27$, Fig. 1) und deshalb findet sich in der Ruhe die CO_2-Spannung des Blutes erniedrigt.

Eine Kurve, zwischen *a* und *b* gelegen, und eine alveolare CO_2-Spannung von 35 mm, illustrieren den Fall, wo das Blut saurer[2]), die Reizbarkeit des Atemzentrums größer als im Fall *a* (alv. CO_2-Spannung 40 mm) geworden sind.

Auch die Möglichkeit, daß sich mit dem Fallen der alveolaren CO_2-Spannung von 40 mm bis auf 35 mm eine erhöhte Erregbarkeit und sogar mehr alkalisch[3]) reagierendes Blut bemerkbar macht, läßt sich theoretisch voraussehen.

Aus der bloßen Änderung der alveolaren CO_2-Spannung läßt sich bezüglich der intermediären Stoffwechselvorgänge nichts schließen, solange die Reizbarkeit des Atemzentrums oder, was daraus folgt, die $C_{H^\cdot}$ des Blutes sich nicht als normal erwiesen haben.

[1]) Journ. of Physiol. 42, 1911.

[2]) Siehe Fußnote 1 S. 408.

[3]) d. h. bei gegebener CO_2-Spannung von niedrigerer $C_{H^\cdot}$.

Die Theorie für die chemische Regulation der Atmung, die aus diesen Erwägungen hervorgeht, läßt sich folgenderweise formulieren: Die Größe der Lungenventilation ist durch die Größe des Reizes und durch die Reizbarkeit des Zentrums bestimmt. Als Reiz fungiert jede Überschreitung der Norm bezüglich der H-Ionenkonzentration des Blutes. Eine gegebene Reizgröße bewirkt eine um so größere Lungenventilation, je reizbarer das Zentrum, eine um so geringere, je weniger empfindlich es ist. Die C_H· des arteriellen Blutes ändert sich demnach umgekehrt wie die Reizbarkeit des Atemzentrums.

Es ist der Zweck dieser Untersuchung, für einige Normalindividuen, zwei männliche und ein weibliches, die Brauchbarkeit dieser Respirationstheorie zu beweisen, auf die uns die Arbeiten dieses Laboratoriums während der letzten Jahre immer zwingender hingeführt haben.

Der Gang dieser Beweisführung wird sich folgendermaßen gestalten:

1. Durch einfache diätetische Anordnungen wird dafür gesorgt, daß die C_H· des Harns große Abweichungen von der Norm nach beiden Seiten hin erleidet. Es wird gezeigt, daß dabei die alveolare CO_2-Spannung sich immer nach der entgegengesetzten Richtung verschiebt.

2. Durch diese diätetischen Eingriffe wird die Reizbarkeit des Atemzentrums nicht geändert.

3. Dahingegen ist die C_H· des Blutes (bei konstanter CO_2-Spannung) bei verschiedener Diät verschieden, und zwar nach derselben Seite hin abweichend wie die des Harns. Die alveolare CO_2-Spannung scheint genau um so viel verschoben zu werden, daß dabei die C_H· des arteriellen Blutes konstant bleibt.

4. In vitro wird die Bedeutung des Mengenverhältnisses Blutkörperchen : Plasma in bezug auf die C_H· des Blutes gezeigt.

5. Durch Morphium wird in einem Falle die Reizbarkeit des Atemzentrums herabgesetzt; ohne irgendeine Erniedrigung der C_H· des Harns wird die alveolare CO_2-Spannung stark erhöht.

6. Ein anderer Fall von experimentell herbeigeführter Er-

höhung der Reizbarkeit und Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung wird mitgeteilt.

7. Andere Beobachtungen, die die Theorie stützen.

Methodisches.

Die alveolare CO_2-Spannung wurde nach Haldane[1]) bestimmt. In den Tabellen sind nur die Werte der mittleren alv. CO_2-Spannung verzeichnet, und zwar als arithmetische Mittelwerte zwischen der alveolaren CO_2 am Ende der Inspiration („Haldane-In.") und der am Ende der Exspiration („Haldane-Ex.") berechnet.

Die Reizbarkeitsbestimmungen sind der Hauptsache nach genau so ausgeführt, wie es Lindhard[2]) in seiner Arbeit aus diesem Laboratorium beschrieb.

Das Prinzip der Bestimmung ist von Cohnstein und Zuntz[3]) angegeben: ohne Kenntnis von der Größe des Reizes, der zu jeder Zeit auf das Zentrum einwirkt, kann man für die Reizbarkeit desselben zu verschiedenen Zeiten ein brauchbares Maß dadurch beschaffen, daß man dem (unbekannten) Reize eine bekannte Größe hinzufügt und die Ausschläge, d. h. die Vergrößerung der Lungenventilation, registriert.

Loewy[4]) hat dieses Prinzip in der Weise zur Anwendung gebracht, daß er bei der Atmung CO_2-haltiger Luftgemische den CO_2-Gehalt der Ausatmungsluft mit der Größe der Totalventilation verglich. Wie Lindhard[5]) zeigte, kann ein solches Vorgehen nur zu groben Annäherungen führen. (Loewy ist es nur gelungen, die Herabsetzung der Reizbarkeit des Atemzentrums durch Morphium zu demonstrieren.) Prinzipiell richtig und im allgemeinen notwendig ist es, die CO_2-Spannung der Alveolarluft mit der Alveolarventilation zu vergleichen.

Man läßt dann die Versuchsperson aus einem großen Spirometer Luftgemische von variiertem CO_2-Gehalt einatmen und bestimmt in einer Anzahl Versuche von z. B. 6 Minuten Dauer und steigenden CO_2-Gehalt der Einatmungsluft die zusammengehörenden Größen der alveolaren CO_2-Spannung und der

---

[1]) Journ. of Physiol. 32, 1905.
[2]) Journ. of Physiol. 42, 1911.
[3]) Arch. f. d. ges. Physiol. 42, 1888.
[4]) Arch. f. d. ges. Physiol. 47, 1890.
[5]) Journ. of Physiol. 42, 1911.

Alveolarventilation. Je stärker — für eine gegebene Vergrößerung der alveolaren CO_2-Spannung — die Alveolarventilation ansteigt, um so größer ist die Reizbarkeit des Atemzentrums.

In bezug auf methodische Details muß ich auf die zitierte Arbeit Lindhards, sowie auf die Abhandlung von Hasselbalch und Lindhard: Analyse des Höhenklimas[1]) verweisen. Nur bemerke ich, daß der schädliche Raum der Atmungsmaske hier so klein wie möglich, ungefähr 35 ccm, gemacht wurde, und daß das capillare Rohr, durch das die Proben der Lungenluft während des Versuchs genommen wurden, bis direkt vor die Nase vorgeschoben war.

Die Proben, die während des letzten Momentes der natürlichen Ausatmung in großer Anzahl genommen wurden, geben von der Zusammensetzung der Alveolarluft am Ende der Exspiration einen genauen Ausdruck. Hasselbalch und Lindhard[1]) haben sich mit Bezug auf die zwei hier benutzten männlichen Versuchspersonen, K. A. H. und J. L., davon überzeugt, und ich habe bei dieser Gelegenheit mit der weiblichen Versuchsperson A. H. eine ähnliche Prüfung dieser sehr bequemen Methode zur Erhaltung von Alveolarluft unternommen.

Tabelle I enthält Elemente einer Reizbarkeitsbestimmung (Versuch S. 424 bis 425 unten), wo zur Kontrolle nach beendigter Probenahme mit eigener Methode eine Alveolarluftprobe ad modum Haldane am Ende der Exspiration genommen wurde. Bei *a* wurde atmosphärische Luft, bei *b* CO_2-Gemische geatmet.

Tabelle I.

Alveolare CO_2-Prozente.

a		*b*	
Eigene Methode	Haldane-Ex.	Eigene Methode	Haldane-Ex.
5,26	5,27	6,17	6,25
5,23	5,29	6,30	6,31
5,19	5,14	6,24	6,32
5,27	5,26	6,24	6,25
Im Durchschnitt **5,24**	**5,24**	6,32	6,37
		6,30	6,34
		6,44	6,34
		6,38	6,30
		Im Durchschnitt **6,30**	**6,31**

[1]) Skand. Arch. f. Physiol. 25, 1911.

Die Bestimmung der $C_{H^{\cdot}}$ im Harn und im Blute geschah mittels Elektrometrie, und zwar unter Benutzung meiner Schaukelmethode, die für CO_2-haltige Flüssigkeiten ausgearbeitet worden ist, indem die Messung der $C_{H^{\cdot}}$ gerade bei der CO_2-Spannung geschieht, die die Flüssigkeit hat, wenn sie in das Elektrodengefäß hineinkommt; zur Schaffung dieser CO_2-Spannung um die Elektrode wird eine erste Portion der Flüssigkeit benutzt, die nachher gegen eine zweite ausgewechselt wird. Die Methode ist von mir[1]) und von Sörensen[2]) im Prinzip beschrieben worden; mit Lundsgaard[3]) habe ich die Methode bei Bluttemperatur zur Anwendung gebracht. Hier habe ich nur unwesentlich die Methode modifiziert, indem das manuelle Schaukeln des Elektrodengefäßes durch ein maschinelles ersetzt worden ist. Die Methode ist dadurch noch bequemer geworden und erfordert, bei noch geringerem Zeitaufwand als vorher, keine Beihilfe[4]).

Der Harn kam immer frisch gelassen, bei $37° \pm 0{,}5$, zur Untersuchung. In ungefähr 5 Minuten war gewöhnlich die vorläufige Potentialkonstanz gesichert, und die zweite Harnportion konnte in das Elektrodengefäß eingelassen werden; die schließliche und korrekte Potentialkonstanz war dann in noch kürzerer Zeit erreicht, wurde aber stets ein- oder mehreremal durch wiederholtes Schaukeln und neue Ablesungen des Elektrometers verifiziert.

Der Fehler, den man durch Wechseln der Versuchsflüssigkeit vermeidet, ist mit gewöhnlichem, recht stark sauer reagierendem Harn sehr gering; er beträgt wohl durchschnittlich $+ 0{,}03$ im Werte des $p_{H^{\cdot}}$. (Beispiel: $p_{H^{\cdot}}$ ohne Wechseln der Harnportion 5,30, $p_{H^{\cdot}}$ nach Wechseln 5,27.) Bei neutralem oder alkalischem Harn würde man bei Unterlassung des Wechselns einen viel größeren Fehler begehen, weil in solchen Flüssigkeiten der Gehalt an CO_2 eine relativ große Rolle in bezug auf die $C_{H^{\cdot}}$ spielt. (Beispiel: $p_{H^{\cdot}}$ vor dem Wechseln 7,12, nach demselben 7,01.)

Die $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes wurde hier, weil es sich bei der gegebenen Fragestellung nicht so sehr um absolute, sondern um quantitativ vergleichbare Werte handelt, aus Bequemlichkeit

---

[1]) Diese Zeitschr. **30**, 1910.

[2]) Ergebn. d. Physiol. **12**, 1912.

[3]) Hasselbalch und Lundsgaard, diese Zeitschr. **38**, 1912; Skand. Arch. f. Physiol. **27**, 1912. — Lundsgaard, diese Zeitschr. **41**, 1912.

[4]) Die ganze Apparatur ist durch Köhler-Leipzig zu beziehen.

bei Zimmertemperatur (18 bis 20°) gemessen. Bei Kaninchen wurde ein Ohr mit Xylol gerieben, um eine kräftige Hyperämie hervorzurufen, dann aus einer Ohrvene schnell 15 ccm Blut durch eine kurze Kanüle in ein Glasgefäß mit einigen Körnchen Hirudin dem Tiere entnommen. In dem Versuch mit K. A. H. wurde das Blut nach leichter Umschnürung des Armes aus einer Armvene entnommen.

Der notwendige Hirudinzusatz erwies sich in Kontrollversuchen bezüglich der $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes als belanglos. Jedenfalls konnte die Hirudinzugabe auf das Mehrfache gesteigert werden ohne jede meßbare Änderung der $C_{H^{\cdot}}$.

Das Blut wurde jetzt während ungefähr einer Stunde in einer geschlossenen „Rollflasche" mit CO_2 von der gewünschten (und später gemessenen) Spannung gesättigt, ehe es zur Messung der $C_{H^{\cdot}}$ benutzt wurde. Das Vorgehen dabei war ganz wie beim Harn. Die gegebene Blutportion konte ohne Schaden für mehrere Messungen bei variierter CO_2-Spannung verwertet werden.

Versuchsanordnung.

Die Bestimmungen verteilte ich folgendermaßen über die Tagesstunden:

	Nr. der Bestimmung					
	1	2	3	4	5	6
Tagesstunde	8h vorm. nüchtern	10h 15′ 1¾ Std. nach 1. Frühstück	11h 45′	2h nachm. 1½ Std. nach 2. Frühstück	3h 30′	4h 45′

In bezug auf den Harn bedeutet dies, daß die Bestimmung Nr. 1 den Nachtharn betraf, indem beim Schlafengehen um 11 Uhr abends zum letztenmal Urin gelassen wurde. Später am Tage ist der Harn (Nr. 2 bis Nr. 6) nur zu den angegebenen Zeiten gelassen worden. Die Harnportion nach dem Mittagessen (um 6 Uhr nachm.) und auch die erwähnte Portion, die vor dem Schlafengehen gelassen wurde, kamen nicht zur Untersuchung.

Die Alveolarluftproben wurden nach dem Harnlassen und nachdem die Versuchsperson sich ungefähr 5 Minuten lang, auf einem Stuhl sitzend, ganz ruhig verhalten hatte, genommen. Zwischen den zwei Proben (Haldane-In. und Haldane-Ex., mit-

unter wurde die Reihenfolge umgekehrt, was übrigens belanglos war) verstrichen 2 bis 5 Minuten.

Die Reizbarkeitsbestimmungen sind, wo nichts anderes bemerkt ist, immer als Bestimmung Nr. 1, also um 8 Uhr morgens, nüchtern, vorgenommen.

Versuchsergebnisse.

I. **Einfluß der Diät auf die C_H. des Harns und auf die alveolare CO_2-Spannung.** In den Tabellen II bis IV sind die Einzelbestimmungen, die diesen Einfluß demonstrieren, aufgeführt. Einige erklärende Bemerkungen sind notwendig.

Die drei Kostformen setzen sich folgendermaßen zusammen:

Mischdiät: Eiweiß, Fett, Kohlenhydrate;
Pflanzenkost: Kohlenhydrate, Fett;
Fleischdiät: Eiweiß, Fett.

Während der Perioden mit gewöhnlicher Kost wurde in allen Fällen ziemlich viel Milch getrunken, dahingegen während der vegetarischen Perioden süßes Bier und während der Fleischperioden gewöhnliches Wasser mit ein wenig Rotwein. Qualitativ wurde die Diät sehr streng gehalten; die Menge der Nahrungsmittel aber war der freien Wahl überlassen und wurde nicht bestimmt. Das Gewicht der Versuchspersonen ist im großen und ganzen während der Versuchsperiode konstant geblieben; die Inanitionstage haben in den drei Fällen einen sehr schnell vorübergehenden Gewichtsverlust von ungefähr 2 kg verursacht. Während der Fleischperiode, die uns allen ziemlich unangenehm war, verloren J. L. und A. H. je 2 kg; weil sie aber sofort am ersten Tage nach dem Aufhören mit der Fleischdiät die 2 kg wieder gewannen, wurde dieser Gewichtsverlust der Hauptsache nach als Wasserverlust aufgefaßt.

Die Harnmengen sind unbekannt, weil es bei der zugrundeliegenden Betrachtung nur auf die C_H. des Harns ankam. Ein Tagesdurchschnitt der C_H. des Harns läßt sich sowohl aus diesem Grunde als auch wegen der fehlenden Untersuchung zweier Harnportionen pro Tag nicht angeben.

Die Zugabe von viermal 2 g $MgSO_4$ zu der Mischkost ist durch de Jagers[1]) Nachweis, daß dabei die Harnacidität zunimmt, inspiriert.

[1]) Diese Zeitschr. 38, 1912.

Bei längerdauernden Untersuchungen kann es in bezug auf die Schwankungen der alveolaren CO_2-Spannung notwendig sein, auf deren Beeinflussung durch die täglichen Barometerschwankungen Rücksicht zu nehmen. Für K. A. H. und J. L. ist die Größenordnung dieses Einflusses aus früheren Untersuchungen[1]) bekannt:

	Bar.	Alv. CO_2 in mm für K. A. H.	J. L.
	755	39,5	37,1
	715	37,4	35,7
Diff.	40	2,1	1,4

Die direkt beobachteten alveolaren CO_2-Spannungen (oder die Mittelwerte einer längeren Reihe) sind demnach in den Tabellen II bis IV auf einen konstanten Luftdruck von 760 mm korrigiert („CO_2 red.“, letzte Kolumne), indem für K. A. H. (und A. H.) mit einer Korrektion von 0,5 mm CO_2, für J. L. mit einer Korrektion von 0,3 mm CO_2 pro 10 mm Luftdruck gerechnet worden ist. Die Korrektion ist ja der Größe nach recht unbedeutend und hätte in Anbetracht der gefundenen Ausschläge unterlassen werden können; daß sie aber berechtigt ist, zeigt für K. A. H. die folgende Beobachtung, wo bei konstanter Diät an 2 Tagen hintereinander die folgenden Werte der alveolaren CO_2 und des Luftdrucks gemessen wurden.

	1	2	3	4	5	6	Tagesmittel	Bar.	CO_2 reduz.
30. I.	42,3	40,9	41,7	41,6	—	42,4	41,8	765	**41,55**
31. I.	40,1	41,7	39,9	41,0	41,5	40,8	40,8	745	**41,55**

Ich gehe jetzt zu der Besprechung der in den Tabellen II bis IV verzeichneten Ergebnisse über.

Tabelle II. K. A. H. Bei der Mischdiät zeigt sich erstens eine regelmäßige Bewegung des $p_{H^{\cdot}}$ im Harn nach den Mahlzeiten. Der Harn ist nach jeder Mahlzeit ohne Ausnahme saurer als vorher geworden. Ca. 3 Stunden nach den Mahlzeiten (Nr. 3 und Nr. 5) zeigt der Harn die geringste Acidität. Der Harn Nr. 6 zeigt annäherungsweise dieselbe $C_{H^{\cdot}}$ wie der Nachtharn, Nr. 1.

[1]) Hasselbalch und Lindhard, Skand. Arch. f. Physiol. 25, 1911.

Tabelle II[1]).

K. A. H. p_H im Harn und mittlere alv. CO_2-Spannung bei verschiedenen Kostformen.

Kostform	Datum	p_H des Harns in Nr.						Mittlere alv. CO_2-Spannung (mm Hg) in Nr.						Tagesmittel	Bar.	CO_2 red.
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6			
Misch-diät	29. XII.	5,74	5,23	6,13	6,07	7,01	6,16	41,8	40,2	40,0	41,3	40,0	40,7	40,7	758	
	3. I.	6,08	5,11	6,94	5,30	5,86	5,79	39,9	40,2	39,4	40,3	41,4	—	40,2	750	
	4. „	5,60	5,13	6,77	5,36	6,48	—	41,0	40,2	41,5	41,7	41,3	—	41,1	752	
	5. „	5,34	4,77	5,94	5,21	6,15	5,53	40,3	40,5	41,3	42,1	43,0	41,5	41,4	745	
	6. „	5,35	5,01	6,42	5,36	5,97	—	41,3	40,1	41,2	40,8	—	—	40,9	742	
	8. „	5,38	5,14	6,63	5,49	5,14	5,32	40,6	40,7	—	41,0	—	41,3	40,9	754	
Mittel		5,58	5,07	6,47	5,47	6,10	5,70							40,9	750	41,4
Inanition	10. „	5,61	6,65	6,50	6,46	5,86	5,23	41,2	41,4	42,1	41,8	41,9	41,8	41,7	768	41,3
	11. „	4,91	4,77	4,83				40,2	39,8	39,3				39,8	778	38,9
Mischdiät					4,77	4,95	5,01				40,9	41,4	41,1		778	
Pflanzen-kost (v. 12. I. an)	13. „	5,21	4,86	7,30	6,73	6,42	6,44	41,1	40,8	41,9	42,4	41,6	—	41,6	782	
	14. „	5,87	5,47	7,65	6,58	—	—	44,7	41,5	43,7	43,0	42,8	—	43,1	781	
	15. „	5,29	5,42	7,61	6,77	7,45	6,98	43,2	42,5	42,5	43,0	43,7	42,9	43,5	776	
Mittel	14.—15. I.	5,58	5,45	7,63	6,68	7,45	6,98							43,3	778	42,4
Fleisch-diät (v. 16. I. an)	17. I.	6,00	5,47	6,23	6,36	6,23	5,69	40,5	41,4	41,1	41,2	40,7	42,1	41,2	780	
	18. „	5,95	5,70	5,05	5,56	5,82	5,44	39,4	40,3	40,1	39,8	40,2	40,4	40,0	780	
	19. „	5,20	5,01	4,80	5,05	5,21	5,34	39,9	38,9	40,0	40,0	40,5	39,0	39,7	776	
	20. „	5,35	5,01	4,95	4,92	5,02	5,04	38,9	39,0	40,2	39,2	39,8	38,3	39,2	767	
Mittel	19.—20. I.	5,28	5,01	4,88	4,99	5,12	5,19							39,5	770	39,0
Mischdiät + $NaHCO_3$ dreimal 8 g (v. 31. I. an)	1. II.	6,71	6,98	7,91	7,14	7,83	7,76	41,5	42,1	41,0	44,1	43,1	43,7	42,6	747	
	2. „	7,07	7,32	7,89	7,75	7,88	7,85	42,0	41,7	43,0	42,9	42,5	44,4	42,8	747	
Mittel		6,89	7,15	7,90	7,45	7,85	7,80							42,7	747	43,3
Mischdiät + $MgSO_4$ viermal 2 g	8. „	5,60	5,46	6,63	5,10	4,95	5,10	41,4	41,2	42,9	39,6	41,6	41,1	41,3	754	
	9. „	5,58	5,17	6,68	5,10	4,50	—	39,9	39,4	40,3	41,9	41,7	—	40,6	750	
	10. „	5,11	4,59	6,08	5,03	5,55	—	40,3	41,6	39,0	38,7	39,5	—	39,8	750	40,3
Inanition	28. „	5,95	6,85	7,01	6,42	6,13	5,22	40,6	42,5	41,7	41,4	40,5	39,7	41,1	760	41,1
	29. „	4,94	4,78	4,79	4,86	4,90	4,81	39,8	39,2	39,8	37,9	38,6	39,5	39,1	762	39,0

[1]) Die fett gedruckten Linien bezeichnen die Mahlzeiten.

Eine entsprechende tägliche Schwankung der CO_2-Spannung der Lungenluft ist nicht zu finden. (Bei anderen Untersuchungen habe ich während der 1. Stunde nach einer Mahlzeit ein deutliches Ansteigen der alveolaren CO_2 um 1 bis 3 mm gefunden. Hier aber ist die CO_2-Spannung erst $1^1/_2$ Stunde nach der Mahlzeit bestimmt.)

Am ersten Inanitionstag wird ein Harn von sehr geringer, später zunehmender Acidität sezerniert. Die alveolare CO_2 ist unverändert geblieben. Am zweiten Inanitionstag ist der Harn sehr sauer, die alveolare CO_2 deutlich abfallend.

Tabelle III.

J. L. p_H im Harn und mittlere alveolare CO_2-Spannung bei verschiedenen Kostformen.

Kostform	Datum	p_H des Harns in Nr.						Mittlere alv. CO_2-Spannung (mm Hg) in Nr.						Tagesmittel	Bar.	CO_2 red.
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6			
Mischdiät	14. II.	5,44	4,93	5,71	6,14	5,75	5,47	—	38,0	37,6	39,3	38,0	38,4	38,3	763	
	15. „	5,25	4,94	5,60	5,45	5,02	5,21	—	38,0	37,5	39,1	39,1	38,2	38,4	765	
	16. „	5,30	5,02	5,67	5,31	4,89	—	—	39,5	38,7	38,2	38,7	—	38,8	768	
Mittel		5,33	4,96	5,66	5,63	5,22	5,34							38,5	765	38,3
Mischdiät	21. „	6,11	7,38	7,83	7,82	7,69	7,53	—	42,2	40,8	42,6	41,8	43,6	42,2	760	
+ $NaHCO_3$	22. „	6,09	7,39	7,72	7,78	7,69	7,53	—	40,2	41,4	43,5	40,2	41,1	41,3	768	
dreimal 8 g	23. „	6,18	7,45	7,78	7,81	—	—	—	43,3	42,8	42,8	—	—	43,0	758	
(v. 20. I. an)																
Mittel		6,13	7,41	7,78	7.80	7,69	7,53							42,2	762	42.1
Fleisch-	6. III.	5,20	4,86	4,88	4,71	4,73	4,80	—	37,8	34,6	36,6	36,7	38,1	36,8	743	
diät	7. „	5,06	5,08	4,71	4,89	4,88	4,79	—	37,5	36,7	38,2	38,4	38,5	37,9	750	
(v. 3. III. an)	8. „	5,06	4,94	4,98	4,93	4,97	—	—	37,4	38,6	37,2	—	—	37,7	759	
Mittel		5,11	4,96	4,86	4,84	4,86	4,80							37,5	751	37,8
Pflanzen-	13. „	5,54	5,90	5,17	5,48	7,14	6,69	—	43,9	42,1	43,7	43,1	44,6	43,5	769	
kost	14. „	6,66	6,69	6,71	6,48	6,93	6,35	—	43,8	42,9	44,5	44,4	43,6	43,8	765	
v. 11. III. an)	15. „	6,74	6,77	7,03	6,41	6,56	—	—	44,7	41,6	43,2	42,8	—	43,1	765	
Mittel	14.–15. III.	6,70	6,73	6,87	6,44	6,75	6,35							43,4	765	43,2

Tabelle IV.

A. H. Mittlere alveolare CO_2-Spannung bei verschiedenen Kostformen.

Kostform	Datum	Mittlere alv. CO_2-Spannung (mm Hg) in Nr.						Tagesmittel	Bar.	CO_2 red.
		1	2	3	4	5	6			
Fleisch-	5. III.	37,6	38,1	38,7	37,1	38,4	—	38,0	744	
diät	6. „	38,1	36,7	34,5	36,3	36,9	36,5	36,5	743	
(v. 3. III. an)	7. „	36,8	37,6	36,8	35,4	36,4	35,9	36,5	750	
	8. „	36,1	36,5	36,8	38,1	36,9	—	36,9	759	
Mittel	6.—8. III.							36,6	751	(37,1)
Pflanzen-	12. III.	41,5	40,8	40,0	41,8	43,7	42,8	41,8	771	
kost	13. „	—	42,5	43,9	44,7	43,7	42,0	43,4	769	
(v. 10. III. an)	14. „	43,3	43,1	43,6	43,6	42,9	42,9	43,2	765	
Mittel	13.–14. III.							43,3	767	(43,0)
Inanition	15. III.	40,0	42,3	40,7	41,2	40,0	39,0		765	
	16. „	38,7	38,4	38,9	35,9	37,0	35,9		759	

Das Frühstück um 12 Uhr läßt die Harnacidität des Nachmittags um ein weniges abnehmen.

Die vegetarische Diät hat erst am 3. Tage zu konstantbleibenden Änderungen geführt; der Harn ist, besonders 3 bis 4 Stunden nach den Mahlzeiten, alkalisch geworden, und die alveolare CO_2 ist über die Norm angestiegen.

Genau das umgekehrte Bild bietet uns die Fleischperiode; erst am 4. Tage sind die Verhältnisse konstant, und zwar ist sowohl der Nachtharn als auch der Tagesharn stark sauer geworden, ungefähr wie am 2. Inanitionstag; die täglichen Schwankungen nach den Mahlzeiten sind beinahe fortgefallen und die alveolare CO_2 ist auf das Niveau der Inanition heruntergefallen.

Die alkalische Diät (Mischdiät mit 3 mal 8 g $NaHCO_3$) bewirkt eine sofort einsetzende alkalische Reaktion des Harns und eine starke Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung.

Die Dosierung von Magnesiumsulfat bewirkt dagegen, in Übereinstimmung mit de Jagers Befunden, einen besonders während der Nachmittagsstunden abnorm sauer reagierenden Harn und eine allmählich abfallende CO_2-Spannung.

Endlich vollziehen sich während der zweiten Inanitionsperiode von 2 ganzen Tagen genau dieselben Änderungen der Funktionen wie das erstemal: am 1. Tage eine zuerst kleine, dann zunehmende Acidität des Harns mit normaler alveolarer CO_2; am 2. Tage ein stark saurer Harn und eine niedrige alveolare CO_2-Spannung. Besonders am 1. Tage tritt der Parallelismus zwischen p_H im Harne und alveolare CO_2 deutlich hervor.

Die Mittelwerte aus den Perioden, während deren die Diät konstante Verhältnisse herbeigeführt hat, sind in der Tabelle hervorgehoben und auf der untenstehenden Fig. 2 verzeichnet.

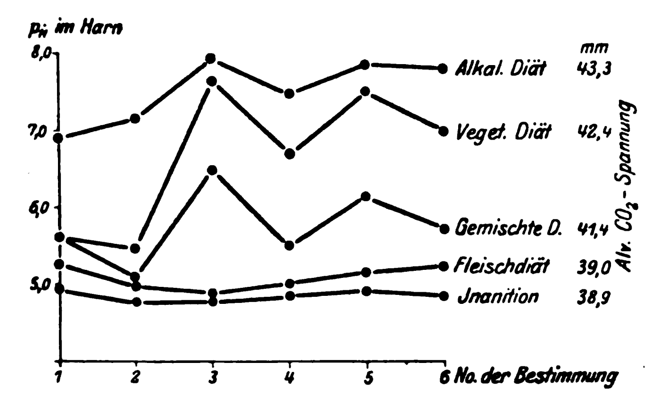


Fig. 2. K. A. H. p_H im Harn und alveolare CO_2-Spannung bei verschiedener Diät.

Man sieht, daß mit zunehmendem $p_{H^{\cdot}}$ (abnehmender $C_{H^{\cdot}}$) des Harns die alveolare CO_2-Spannung ansteigt.

Tabelle III. J. L. Diese Versuchsperson sezerniert unter gewöhnlicher Ernährung einen Harn von größerer Acidität als K. A. H. Ebenso ist die alveolare CO_2-Spannung J. L.s sowohl hier wie auch sonst[1]) immer niedriger als die K. A. H.s unter ähnlichen Bedingungen befunden. Es verdient in dieser Hinsicht Beachtung, daß J. L. mager ist im Vergleich zu K. A. H., der ein normal entwickeltes subcutanes Fettgewebe besitzt. — Die täglichen Schwankungen des $p_{H^{\cdot}}$ nach den Mahlzeiten sind bei J. L. nicht regelmäßig vorhanden und jedenfalls nicht so ausgeprägt wie bei K. A. H.

Die Fleischdiät ändert dann auch nur wenig an der Größe der $C_{H^{\cdot}}$ im Harn und an der alveolaren CO_2 J. L.s, doch bewegen sich die Änderungen in der erwarteten Richtung.

Die alkalische Diät und die vegetarische Diät dahingegen bewirken bei dieser Versuchsperson eine beträchtliche Erhöhung sowohl des $p_{H^{\cdot}}$ als der alveolaren CO_2. (Daß bei der vegetarischen Diät die alveolare CO_2 den größeren Wert erreicht, obschon das Tagesniveau des $p_{H^{\cdot}}$ bei der alkalischen Diät höher liegt, könnte damit in Verbindung stehen, daß der $p_{H^{\cdot}}$ des Nachtharns bei der vegetarischen Diät am höchsten liegt.)

Auf der untenstehenden Fig. 3 sind die Ergebnisse der Tabelle III graphisch dargestellt.

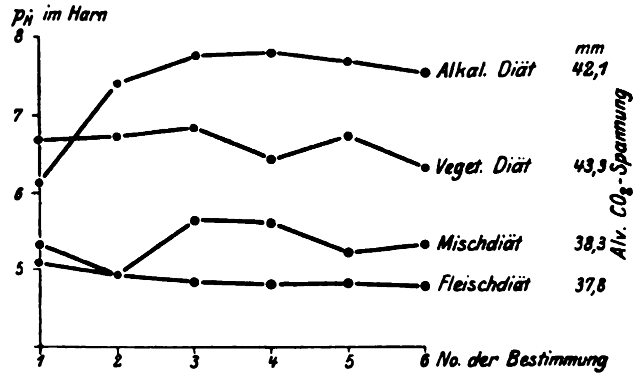


Fig. 3. J. L. $p_{H^{\cdot}}$ im Harn und alveolare CO_2-Spannung bei verschiedener Diät.

[1]) Hasselbalch und Lindhard, l. c. S. 380 u. 381.

Die Tabelle IV, A. H., zeigt den Einfluß der Fleischdiät und der vegetarischen Diät auf die alveolare CO_2-Spannung der weiblichen Versuchsperson. Die C_H· des Harns wurde hier nicht bestimmt. Bei der Fleischdiät erwies sich die CO_2-Spannung als um 6 mm niedriger als bei der vegetarischen Diät. Die Inanition ergab bezüglich der alveolaren CO_2 das jetzt bekannte Bild. Erst gegen das Ende des 2. Tages wurden die niedrigen Werte der Fleischperiode erreicht.

Die Ergebnisse der Tabellen II bis IV lassen sich in folgender Weise zusammenfassen: Eine Diät, die einen sauren Harn verursacht, bewirkt eine niedrige CO_2-Spannung des Blutes; eine Diät, die einen weniger sauren oder alkalischen Harn verursacht, bewirkt gleichzeitig eine hohe CO_2-Spannung des Blutes. Die Einstellung durch diesen Regulationsmechanismus kann mehrere Tage beanspruchen.

Durch die Arbeit früherer Forscher war dieses Ergebnis schon im voraus zu erwarten. v. Skramlik[1]) hat den Einfluß einer strengen Kohlenhydratkost, der Milchdiät und der Fleischdiät auf die C_H· des Tagesharns dreier gesunder Männer untersucht. Am 4. Versuchstage waren in den drei Fällen annähernd konstante und übereinstimmende Werte des p_H· erreicht, und zwar bei

	p_H·
Kohlenhydratkost	5,84 bis 5,99
Milchdiät	5,86 „ 6,06
Fleischdiät	5,27 „ 5,37

Der Harn einer jungen Dame, bei Diabetikerkost, zeigte einen p_H· von 5,02 bis 5,23.

v. Skramliks und meine Messungen zeigen, daß es ohne Rücksichtnahme auf die Diät und den Ernährungszustand des Patienten unmöglich ist, aus der C_H· des Harns irgendwelche diagnostischen Schlüsse zu ziehen, wie dies bisher mehrfach geschehen ist. Fast alle bisher konstatierten „pathologischen“ Abweichungen von der „Norm“ bezüglich der C_H· des Harns fallen innerhalb des Bereiches meiner experimentell, durch Diätänderungen herbeigeführten Variationen.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 1911.

Was den Einfluß der Diät auf die alveolare CO_2-Spannung betrifft, so haben Porges, Leimdörfer und Markovici[1]) nach Beobachtungen von Diabetikern vermutet, daß „vielleicht die Diät eine gewisse Rolle spielt insofern, als die Bevorzugung der Eiweißkost durch die saure Fleischasche eine Herabsetzung der Kohlensäurespannung, die kohlenhydratreiche Kost durch die alkalische Pflanzenasche eine Erhöhung derselben herbeiführen mag". Diese Vermutung ist durch meine Beobachtungen vollauf bestätigt worden.

II. Es wäre nun möglich, daß diese diätetischen Eingriffe an der Blutbeschaffenheit gar nichts geändert hätten, sondern daß die Wirkung auf die Spannung der Blutkohlensäure dadurch zustande käme, daß primär die Reizbarkeit des Atemzentrums durch die Eingriffe geändert wäre. Die vegetarische Diät z. B. sollte die Reizbarkeit des Atemzentrums auf irgendeine Weise herabsetzen und so die erhöhte CO_2-Spannung des in seiner Beschaffenheit unveränderten Blutes bewirken. Wie verhält sich denn die Reizbarkeit des Atemzentrums unter verschiedenen Kostformen?

Um diese Frage zu beantworten, kann man, wie in der Einleitung gezeigt wurde, die CO_2-Spannung der Alveolarluft um eine bekannte Größe erhöhen und die dadurch bewirkte Vergrößerung der Alveolarventilation ausmessen.

Auf der Fig. 4 sind in graphischer Darstellung die mit K. A. H. unter verschiedener Diät ausgeführten Einzelbestimmungen dieser Art wiedergegeben.

Sie zeigen, daß die Diätänderung an der Reizbarkeit des Atemzentrums nichts geändert hat. Die untenstehende kleine Tabelle gibt die weiteren Aufschlüsse, die nötig sind, um den Mechanismus der Atmungsänderung zu übersehen.

	Alv. CO_2 mm	Alv. Ventil L. pro Min. 37°	Alv. Ventil. Erhöhung bei 7 mm Erhöhung der alv. CO_2-Spannung
9. IV. bis 13. IV. Fleischdiät (5 Best.)	38,5	4,40	4,8
17. IV. bis 20. IV. Veget. Diät (4 Best.)	43,1	4,08	4,8

Gehen wir von der Fleischdiät aus, so hat die vegetarische Diät eine Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung bewirkt, die

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 73.

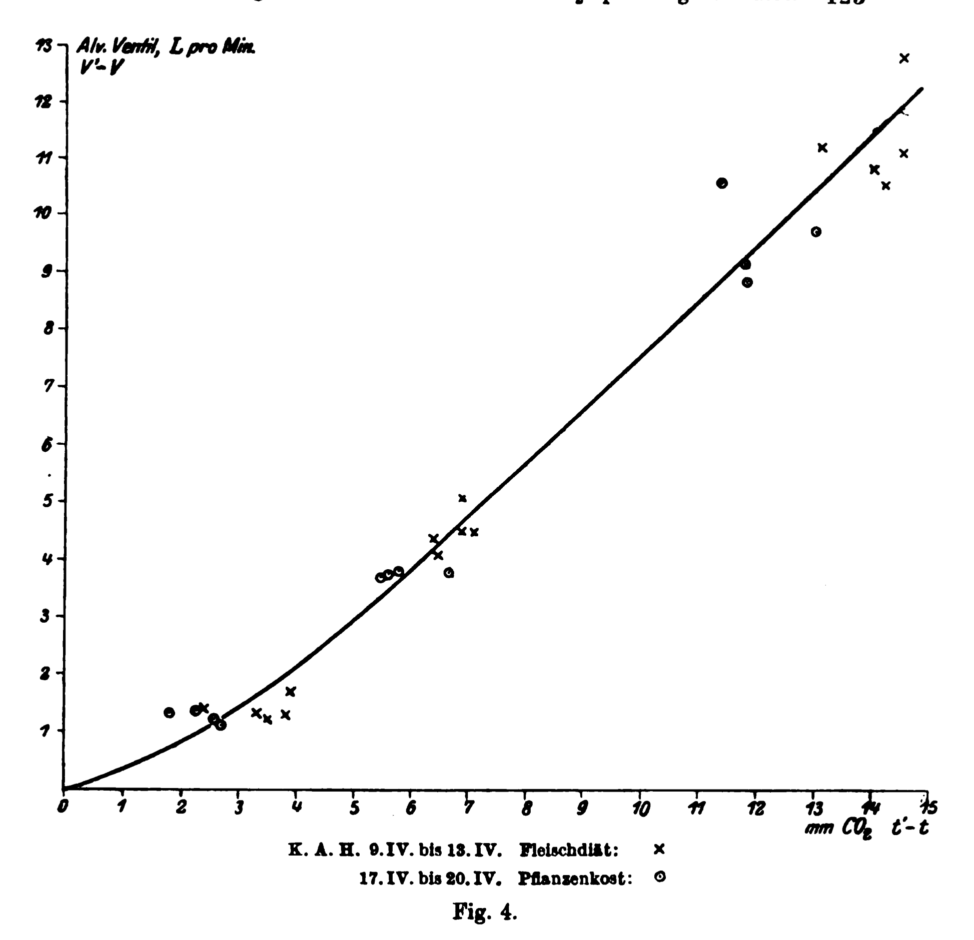
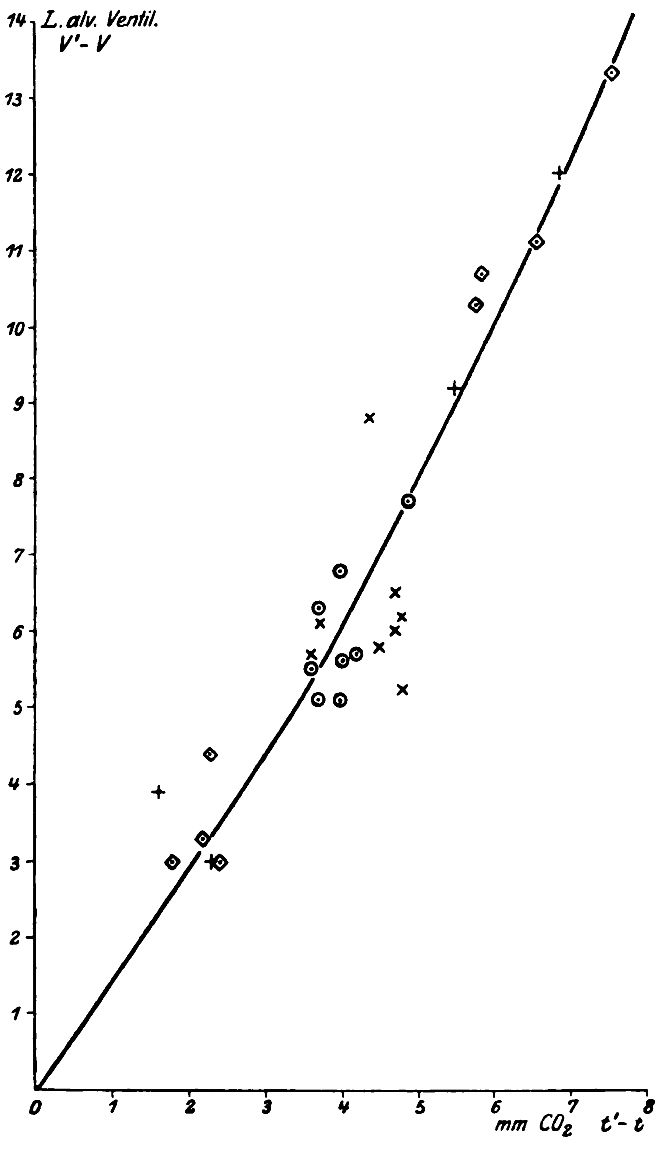


Fig. 4.

[hauptsächlich[1])] durch die herabgesetzte Lungenventilation zustande gekommen ist. Erhöht man aber künstlich die alveolare CO_2-Spannung um eine gegebene Größe, dann erweist sich die Reizwirkung der CO_2 auf das Atemzentrum als gänzlich unverändert. Die einzig mögliche Deutung scheint demnach die zu sein, daß die CO_2 des Blutes auf das Atemzentrum nur indirekt wirkt: durch die Erhaltung einer konstanten Reaktion des Blutes, das das Atemzentrum umspült; hierzu ist bei dem mehr alkalischen[2]) Blute in

[1]) Die CO_2-Produktion ist nämlich beinahe unverändert geblieben: 38,5 × 4,40 beinahe gleich 43,1 × 4,08.

[2]) Siehe Fußnote 3, S. 409.



A. H. Mischdiät, 19. III. bis 23. III.: ×
Pflanzenkost, 27. III. bis 30. III.: ⊙
Mischdiät, 24. IV. bis 25. IV.: +
do. nach Lichtbad, 26. IV. bis 30. IV.: ◇

Fig. 5.

der Kohlenhydratdiät eine höhere CO_2-Spannung nötig als bei dem saureren[1]) Blute in der Fleischdiät.

Fig. 5 zeigt das übereinstimmende Ergebnis der Untersuchungen mit A. H., und die untenstehende Tabelle enthält weitere Elemente zur Beurteilung der Atmungstätigkeit A. H.s bei verschiedener Diät[2]).

	Alv. CO_2 mm	Alv. Vent. Luftdr. pro Min., 37°	Erhöhung der alv. Vent. bei 4 mm. Erhöhung der alv. CO_2
19. III. bis 23. III.: Mischdiät (8 Best.)	36,6	3,77	6,0
27. III. bis 30. III.: Kohlenhydratkost (8 Best.) . .	40,4	3,67	6,0

Wenn man demnach anerkennen muß, daß eine Diät, die allem Anschein nach (s. unten) das Blut alkalischer macht, gleichzeitig eine Herabsetzung der Lungenventilation und dadurch eine höhere alveolare CO_2-Spannung verursacht, während doch die Reizwirkung einer Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung über die Norm heraus dieselbe bleibt, so drängt sich die Auffassung auf, daß in der Ruhe die Atmungstätigkeit, die Auslüftung des Blutes, so bemessen wird, daß nicht die CO_2-Spannung, sondern die „totale Acidität", die $C_H\cdot$ des Blutes, konstant bleibt.

III. Wird nun wirklich die Blutbeschaffenheit (die $C_H\cdot$ des Blutes bei gegebener CO_2-Spannung) durch die Diät beeinflußt? Und wenn, dann in welcher Richtung?

Zur Aufklärung dieser Frage habe ich Versuche mit zwei Kaninchen, einem männlichen und einem weiblichen, angestellt. Weil aber während der Beobachtungszeit das Weibchen schwanger wurde, was augenscheinlich nicht ohne Einfluß auf die Blutbeschaffenheit blieb, sind hier nur die Bestimmungen an dem Männchen angeführt, und zwar in graphischer Darstellung (Fig. 6).

Das Gewicht des Kaninchens schwankte zwischen 2,5 und 2,7 kg. Ich erinnere daran, daß die Bestimmungen bei Zimmertemperatur angestellt worden sind. Bei Bluttemperatur würden die Werte des $p_H\cdot$ ein wenig kleiner ausfallen.

---

[1]) Siehe Fußnote S. 408.

[2]) Das negative Ergebnis der Lichtbadbehandlung wird unten Erwähnung finden.

Aus der Fig. 6 ist ersichtlich, daß bei gegebener CO_2-Spannung, z. B. bei 40 mm, die $C_H\cdot$ des Kaninchenblutes am geringsten bei der Haferfütterung ist, $10^{-7,36}$, bei Grünfutter größer wird, $10^{-7,24}$, und am größten nach der (zweitägigen) Inanitionsperiode, $10^{-7,15}$. Nach erneuerter Grünfutterernährung ist die $C_H\cdot$ zwei Tage später wieder ungefähr wie zuvor, $17^{-7,27}$.

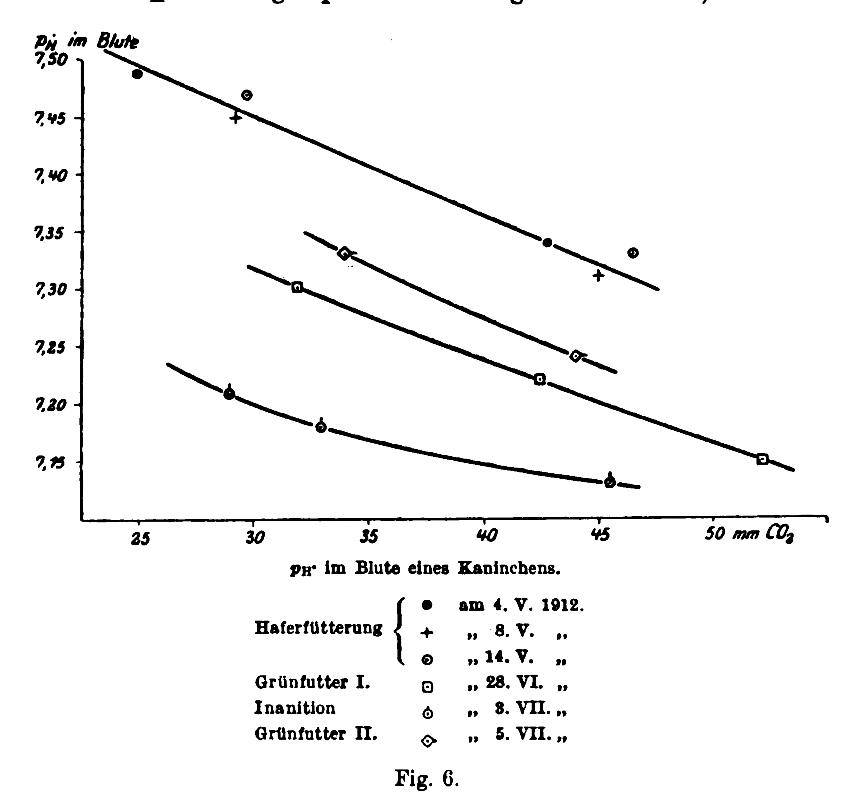


Fig. 6.

Das Ergebnis stimmt demnach, jedenfalls qualitativ, mit der „Neutralitätstheorie" überein, indem ein Eingriff — die Inanition —, die beim Menschen die Spannung der Blutkohlensäure herabsetzt, beim Tier ein saureres Blut herbeiführt.

Um die Ansäuerung des Blutes durch die Atmung vollständig zu kompensieren, müßte das Kaninchen, das während der ersten Grünfutterperiode einen $p_H\cdot = 7,24$ bei der angenommenen alveolaren CO_2-Spannung von 40 mm hatte, um während der Inanition dieselbe $C_H\cdot$ des Blutes aufrechtzuer-

halten, eine alveolare CO_2-Spannung von 26 mm (s. Fig. 6) bekommen. Für diese Berechnung ist also die Annahme einer unverändert gebliebenen Reizbarkeit des Atemzentrums die Voraussetzung.

Die Beweiskette für die Geltung der „Neutralitätstheorie" kann jedoch nicht als geschlossen betrachtet werden, bevor wir bei einem Individuum experimentell

1. die Reizbarkeit des Atemzentrums konstant erhalten,
2. die alveolare CO_2-Spannung ändern und dabei
3. die $C_{H^\cdot}$ des Blutes konstant zu erhalten vermögen.

Für diesen Nachweis wird ein menschliches Versuchsindividuum notwendig sein, weil sowohl die Reizbarkeit des Atemzentrums als auch die alveolare CO_2-Spannung nur an Menschen mit genügender Genauigkeit bestimmt werden kann.

Wenn wir als Eingriff den Wechsel einer Fleischdiät mit einer vegetarischen Diät wählen, so wissen wir im voraus (s. o.), daß hierdurch die Reizbarkeit des Atemzentrums nicht meßbar verändert wird.

Versuch. Am 27. VI. morgens fing K. A. H. mit der Fleischdiät an. Am Vormittag den 29. VI. war seine alveolare CO_2-Spannung in sechs sukzessiven Bestimmungen: 38,6, 39,8, 38,4, 39,4, 38,5, 38,7 mm, im Durchschnitt 38,9 mm. Der $p_{H^\cdot}$ seines Blutes war

	bei mm CO_2	$p_{H^\cdot}$
	37,6	7,35
	43,9	7,31
demnach bei	38,9	7,34

Am 1. VII. wurde mit der Pflanzenkost angefangen. Am 4. VII. vormittags war die alveolare Spannung in fünf sukzessiven Bestimmungen: 43,8, 42,5, 42,8, 43,9, 43,4 mm, im Durchschnitt 43,3 mm. Der $p_{H^\cdot}$ seines Blutes war

	bei mm CO_2	$p_{H^\cdot}$
	40,3	7,42
	45,3	7,34
demnach bei	43,3	7,36

Zusammenfassend ergab sich also:

	Alv. CO_2 mm	$p_H\cdot$ des Blutes bei 40 mm CO_2	$p_H\cdot$ des Blutes bei alv. CO_2-Spann.
Fleischdiät . .	38,9	7,33	**7,34**
Veget. Diät . .	43,3	7,42	**7,36**

Das Blut ist demnach bei der Fleischdiät saurer als bei der vegetarischen Diät ($p_H\cdot = 7,33$ gegen 7,42); durch die niedrigere Spannung der Blutkohlensäure (38,9 gegen 43,3 mm) wird dies aber so weit kompensiert, daß faktisch die $C_H\cdot$ des Blutes unverändert bleibt ($p_H\cdot = 7,34$ gegen 7,36).

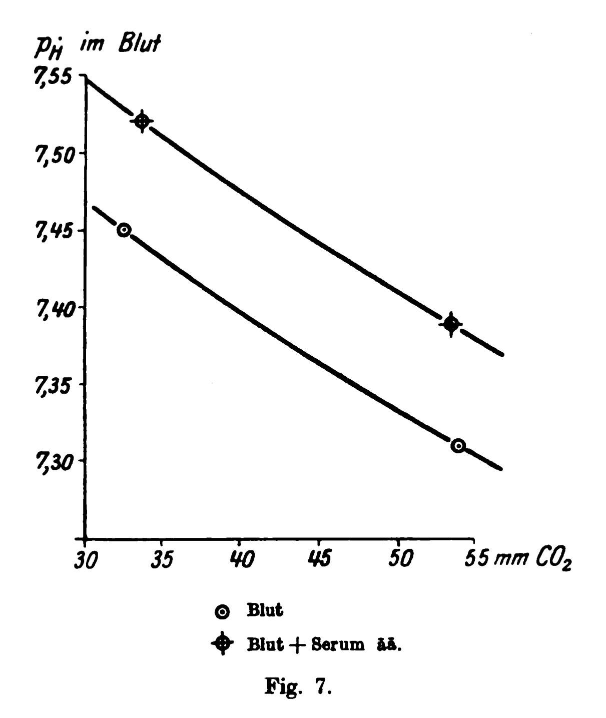
IV. Ich habe schon mehrmals darauf aufmerksam gemacht, daß es bei Untersuchungen über die Neutralitätsregulation durch die Atmung notwendig ist, auf das Mengenverhältnis $\frac{\text{Blutkörperchen}}{\text{Plasma}}$ Rücksicht zu nehmen, um eventuelle Trugschlüsse in der Richtung intermediärer saurer Stoffwechselprodukte zu vermeiden. Das Blut reagiert nämlich bei gegebener CO_2-Spannung um so saurer, je mehr Blutkörperchen es enthält.

Ein Versuch, die Größenordnung solcher Wirkungen auf die $C_H\cdot$ des Blutes festzustellen, ist auf Fig. 7 graphisch dargestellt. Es handelt sich um defibriniertes Ochsenblut, das mit gleichen Teilen Ochsenserum versetzt ist. Die Messungen sind bei Zimmertemperatur (19°) vorgenommen.

Der Abszissenabstand der beiden Kurven beträgt ungefähr 12 mm CO_2, d. h. um eine konstante $C_H\cdot$ zu bewahren, muß das Blut von der halbnormalen Blutkörperchenkonzentration eine um 12 mm höhere CO_2-Spannung haben als das unverdünnte Blut.

Bei einem anderen Versuche, ebenfalls mit defibriniertem Ochsenblute, habe ich geringere Abweichungen von der Norm gefunden:

	mm CO_2	$p_H\cdot$
Blut	42,0	7,34
25 Blut + 5 Serum	41,7	7,37
25 Blut + 5 Blutkörperchenbrei	41,4	7,30



⊙ Blut

⊕ Blut + Serum āā.

Fig. 7.

Nehmen wir einen ähnlichen Verlauf der p_{H}·-Kurven an, wie auf Fig. 7, so beträgt der Abszissenabstand hier je 4,5 mm, d. h. in dem mit Serum verdünnten Blut muß die CO_2-Spannung 4,5 mm höher, in dem mit einem Überschuß an Blutkörperchen versetzten Blut 4,5 mm niedriger sein als in dem ursprünglichen Blute, um dieselbe C_{H}· hervorzubringen.

Die Möglichkeit ist demnach vorhanden, daß es bei den diätetisch herbeigeführten Änderungen der Blutbeschaffenheit und der alveolaren CO_2-Spannung sich um zugrundeliegende Variationen in der Blutkonzentration handeln könnte, daß also bei meinen Versuchen die Blutkörperchenkonzentration bei Eiweiß-Fett-Nahrung höher als bei Kohlenhydrat-Fett-Nahrung gewesen ist, was ja keineswegs befremdend wirkt. Diesbezügliche Messungen habe ich nicht vorgenommen.

In den physiologischen und pathologischen Polyglobulien und Anämien wird vielleicht diese Genese einer anormalen alveolaren CO_2-Spannung vorkommen können.

V. Wir haben uns bisher mit dem Fall beschäftigt, daß die Reizbarkeit des Atemzentrums konstant erhalten wird, und wir sind dabei zu der Auffassung gelangt, daß die „Konstanz“ der alveolaren CO_2-Spannung nur ein Produkt konstant erhaltener Versuchsbedingungen ist. Die Funktion, die bei konstanter Reizbarkeit des Atemzentrums wirklich konstant bleibt, ist die H-Ionenkonzentration des Blutes. Hiermit scheint die erste Hälfte der aufgestellten Theorie bewiesen zu sein: die CO_2 des Blutes wirkt als Reiz auf das Atemzentrum nur insofern, als durch ihre Anhäufung die Norm für H-Ionen im Blute überschritten wird.

Eine Überschreitung dieser Norm mit einer gegebenen Größe bewirkt aber bei großer Reizbarkeit des Atemzentrums eine größere Erhöhung der Lungenventilation als bei niedriger. Nehmen wir eine konstante Blutbeschaffenheit an (Fig. 1, S. 408, Kurve *a*), so wird die $C_{H^{\cdot}}$ und die CO_2-Spannung des Blutes kleiner bei großer als bei niedriger Reizbarkeit des Zentrums. Fig. 8 illustriert das Gesagte. Kurve *a* zeigt eine faktisch beobachtete Steigerung der alveolaren Ventilation (K. A. H., Fig. 4, S. 423) bei künstlicher Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung von 40 mm an. Durch Extrapolation (punktierter Teil der Kurve *a*) läßt sich die CO_2-Spannung, wo die Ventilation 0 eintritt — der Apnöepunkt —, auf 30 mm schätzen. Nehmen wir jetzt an, daß die Reizbarkeit des Zentrums so viel größer wird, daß eine Ventilationskurve *b* (Fig. 8) beobachtet wird. Die Blutbeschaffenheit, und demnach der Apnöepunkt bei 30 mm, sind unverändert geblieben; die alveolare CO_2-Spannung bei natürlicher Atmung muß also jetzt 35 mm betragen, falls der Stoffwechsel unverändert geblieben ist (d. h. alv. Vent. $\times$ alv. CO_2 = konst., oder $4{,}2 \times 40 = 4{,}8 \times 35$).

Es geht aus der Betrachtung der Fig. 8 (Kurven *a* und *b*) der praktisch wichtige Schluß hervor, daß eine reine Reizbarkeitserhöhung zwar ein Fallen der alveolaren CO_2-Spannung bewirken kann — und muß —, daß aber die neue alveolare CO_2-Spannung die von dem Apnöepunkt gesetzte Grenze nicht erreichen kann. Nur bei sehr niedriger Reizbarkeit des Atemzentrums wird der Apnöepunkt mehr wie 10 mm unterhalb der alveolaren CO_2 bei natürlicher Atmung gelegen sein. Eine reine Reizbarkeitserhöhung kann dem-

zufolge **keine sehr bedeutende Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung bewirken, mehr wie 5 mm praktisch wohl nie.**

Die Kurve *c* (Fig. 8) illustriert den unter dem Abschnitt III behandelten Fall, daß durch Ansäuerung des Blutes die alveolare CO_2-Spannung herabgedrückt worden ist, während die Reizbarkeit des Zentrums unverändert (gegen Kurve *a*) geblieben ist. Die Kurven *b* und *c* erläutern die beiden Mechanismen, wodurch am einfachsten eine Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung von 40 mm bis auf 35 mm erklärt werden kann. Siehe auch Fig. 1, S. 408, und die daran geknüpfte Diskussion.

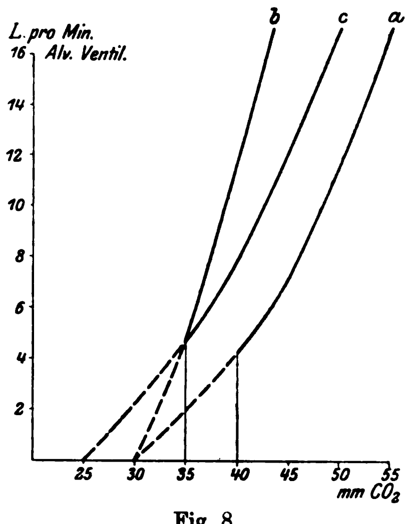


Fig. 8.

Um den Einfluß einer Reizbarkeitsänderung auf die alveolare CO_2 zu demonstieren, muß man einen Eingriff von gewisser Dauer wählen, weil es sich gezeigt hat, daß **diese Einstellung eine ziemlich lange Zeit in Anspruch nimmt.** Bei Laboratoriumsversuchen von kurzer Dauer (einer halben oder einer ganzen Stunde) mit der Einatmung **reinen** Sauerstoffes wird die alveolare CO_2-Spannung **in der Regel nicht erhöht,** obschon die herabgesetzte Reizbarkeit des Atemzentrums sich regelmäßig zeigt, sobald nur **genügend** (4 bis 8%) CO_2 der Einatmungsluft beigemischt wird. Ein pneumatisches Kabinett, wo die Atmung bei erhöhtem Sauerstoffdruck längere Zeit hindurch fortgesetzt werden konnte, stand mir nicht zur Verfügung

Dahingegen erbot sich als passender Eingriff eine protrahierte **Morphiumwirkung,** auch deshalb, weil die dadurch bewirkte Herabsetzung der Reizbarkeit des Atemzentrums sowohl an Menschen (**Loewy,** l. c., **Lindhard,** l. c.) als auch an Tieren [**Straub**[1])] gezeigt worden ist und als feststehende Tatsache betrachtet werden kann.

---

[1]) Diese Zeitschr. **41,** 1912.

Versuch. Bei gewöhnlicher Diät wurde an K. A. H. die alveolare CO_2-Spannung und die Reizbarkeit des Atemzentrums mit der schon beschriebenen Methodik festgestellt, und zwar am 31. V. und 1. VI. durch zwei Morgenversuche und zwei Bestimmungen um 11 Uhr vormittags. Vom 1. VI. abends an wurde mit der Dosierung per os von 4 × 15 mg Chloret. muriat. täglich angefangen, und die alveolare CO_2 sowie auch die Reizbarkeit des Atemzentrums am 3. VI. und 4. VI. zu denselben Tageszeiten in ebenso vielen Versuchen bestimmt.

	Alv. CO_2-Sp. mm	Alv. Ventil. L. pr. Min. 37°	Erhöhung der alv. Ventil. bei Erhöhung der alv. CO_2 um 7 mm	um 13 mm
31. V. bis 1. VI. Ohne Morphium (4 Bestimmgn.)	41,0	4,62	4,8 L. pro Min.	11,3 L. pro Min.
3. VI. bis 4. VI. Mit Morphium (4 Bestimmgn.)	44,2	4,35	2,8 L. pro Min.	8,4 L. pro Min.

In der Vorperiode ist die Reizbarkeit des Atemzentrums genau dieselbe, wie sie etwa 6 Wochen vorher für K. A. H. war (s. Fig. 4, S. 423).

In der Morphiumperiode aber ist die Reizbarkeit CO_2 gegenüber stark herabgesetzt. Gleichzeitig ist durch verringerte Lungenventilation die alveolare CO_2-Spannung um 3,2 mm angestiegen.

Diese Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung ist nicht durch zufällige Diätfehler mit etwa einer Bevorzugung der kohlenhydratreicheren Nahrungsmittel während der Morphiumperiode zustande gekommen. Das wird durch die gleichzeitig vorgenommenen Messungen der $C_{H^\cdot}$ des Harns bewiesen, die untenstehend verzeichnet sind.

		$p_{H^\cdot}$ des Harns (37°)					
Nr. der Bestimmung		1	2	3	4	5	6
31. V.	Ohne Morphium	5,83	4,88	5,43	5,98	6,92	6,48
1. VI.	Ohne Morphium	5,83	4,77	5,80	5,93	6,20	6,05
3. VI.	Mit Morphium	5,63	4,73	5,35	5,01	4,94	4,82
4. VI.	Mit Morphium	6,30	4,83	4,78	5,11	4,71	4,78

Der Harn ist während der Morphiumperiode eher saurer als in der Vorperiode, alkalischer ist er jedenfalls nicht.

Der Versuch kann demnach nicht anders gedeutet werden, als daß die herabgesetzte Erregbarkeit des Atemzentrums eine Erhöhung der Reizschwelle für die CO_2 und damit für die $C_{H\cdot}$ des Blutes bewirkt hat[1]).

VI. Auch das Gegenbild der Morphiumwirkung konnte experimentell erzeugt werden. Von früheren Beobachtungen[2]) war es mir bekannt, daß wenn J. L. die Haut des Gesichts und der Hände einer ultraviolettreichen Lichtquelle aussetzte, außer dem Lichterythem oder durch dasselbe eine Erhöhung der Reizbarkeit des Atemzentrums mit Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung eintrat.

Unter der von gleichzeitigen C_{H}·-Messungen des Harns abgegebenen Kontrolle wurde nun dieser Befund bestätigt.

Versuch. Bei gewöhnlicher Diät wurde zuerst in einer 2tägigen Vorperiode — 7. VI. bis 8. VI. — die Reizbarkeit des Atemzentrums in zwei Morgenversuchen und einem Vormittagsversuche bestimmt. Die alveolare CO_2-Spannung und die C_{H}· des Harns wurde zu den gewöhnlichen Tageszeiten gemessen. Die Lichtbehandlung bestand darin, 1. daß das Gesicht und die Hände dem unkonzentrierten Licht einer Kohlenbogenlampe (30 Amp., 50 V.) in 1 m Entfernung, am 8. VI. und 9. VI. nachmittags 2mal $^1/_2$ Stunde ausgesetzt wurde (danach nur ganz leichtes Erythem), 2. in einer Exposition derselben Hautgebiete, von 45 Min. Dauer in größtmöglicher Nähe (ca. 50 cm) einer ähnlichen Lichtquelle, am 10. VI. (starkes Erythem), 3. in einem universellen Lichtbade von 1 Stunde Dauer in dem Licht zweier Kohlenbogenlampen (75 Amp., 50 V.), am 11. VI. nachmittags (kräftiges, universelles Erythem). Die zwei ersten Expositionen blieben in jeder Beziehung ohne meßbaren Erfolg, erst nach der Exposition am 10. VI. bildete sich mit dem Lichterythem des Gesichtes und der Hände der unten verzeichnete Symptomenkomplex aus, der durch das nachfolgende universelle Lichtbad am 11. VI. in keiner Beziehung stärker ausgeprägt wurde.

---

[1]) Nach der Kurve *a* (Fig. 1) berechnet, sollte in der Morphiumperiode der p_{H}· des arteriellen Blutes 7,18 gegen 7,19 in der Vorperiode betragen, ein Unterschied, der mit den vorhandenen Meßmethoden kaum nachweisbar wäre.

[2]) Hasselbalch und Lindhard, Skand. Arch. f. Physiol. 25, 1911.

Nr. der Bestimmung		Alv. CO_2 (Haldane, Ex.), mm 2	3	4	5	6	Tagesmittel	Bar.	CO_2 reduz.
Vorperiode	Am 7. VI.	43,6	—	42,9	42,0	42,2	**42,2**	762	42,1
Vorperiode	Am 8. VI.	—	42,0	41,7	42,2	41,9	**42,0**	758	42,1
Nach partiellem Lichtbad	Am 11. VI.	40,1	38,8	40,1	40,5	—	**39,9**	757	40,0
Nach universellem Lichtbad	Am 13. VI.	40,7	—	39,9	40,0	—	**40,2**	754	40,4

Von den Reizbarkeitsbestimmungen sind untenstehend die Mittelwerte der Vorperiode und der „Lichtperiode" angeführt.

	Erhöhung der alv. Ventil. bei Erhöhung der alv. CO_2 um 2 mm	um 8 mm
7. VI. bis 8. VI. (3 Bestimmungen)	3,6 L. pro Min.	19,4 L. pro Min.
11. VI. bis 13. VI. (3 Bestimmungen)	6,8 L. pro Min.	21,7 L. pro Min.

Daß die Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung in der „Lichtperiode" nicht von zufälligen Diätfehlern herrühren kann, geht aus den Messungen der Harnacidität hervor.

Nr. der Bestimmung		p_H· im Harn (37°) 1	2	3	4	5	6
Vorperiode .	7. VI.	5,21	4,84	4,89	4,79	4,86	4,93
	8. „	5,15	5,08	5,01	4,88	5,37	5,31
Lichtperiode	11. „	5,04	4,99	5,05	4,99	5,39	—
	13. „	5,09	5,37	5,29	5,62	5,86	—

Der Harn ist während der „Lichtperiode" eher etwas alkalischer als vorher geworden, saurer jedenfalls nicht. Die Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung um 2 mm läßt sich demnach nur durch die konstatierte Erhöhung der Reizbarkeit[1]) des Atemzentrums erklären.

[1]) Rein äußerlich muß diese Reizbarkeitsbestimmung als nicht sehr gelungen bezeichnet werden, indem in der Lichtperiode die Ventilationserhöhung bei Steigerung der alveolaren CO_2 etwas unregelmäßig anwächst. Viel regelmäßiger gestalteten sich die Versuchsergebnisse mit J. L. nach der Lichtbehandlung in früheren Untersuchungen. Siehe Hasselbalch und Lindhard (l. c. S. 392) und Lindhard (Skand. Arch. f. Physiol. **26**, 1912).

Wie bereits oben erwähnt wurde, bewirkte auch bei früheren Untersuchungen von J. L. (im Hochgebirge) die ultraviolette Strahlung eine deutliche und dauerhafte Abnahme der alveolaren CO_2-Spannung. Diese Wirkung des Lichtes ist von Durig, v. Schrötter und N. Zuntz[1]) bestätigt und als die am eindeutigsten dem Lichtklima des Hochgebirges zuzuschreibende bezeichnet worden.

Es ist nun von Wichtigkeit und von gewisser Beweiskraft mit Bezug auf den ursächlichen Zusammenhang zwischen Reizbarkeit und alveolarer CO_2-Spannung, daß entweder bei K. A. H.[2]) oder bei A. H. eine solche Wirkung des Lichtes auf die Höhe der alveolaren CO_2-Spannung nachweisbar ist, ebenso wie auch die Reizbarkeit des Atemzentrums bei diesen zwei Personen von dem Licht unbeeinflußt bleibt.

Die hierhergehörenden Bestimmungen in bezug auf A. H. sind auf Fig. 5 (S. 424) graphisch wiedergegeben. Die das Bild ergänzenden Zahlengrößen folgen hier:

	Alv. CO_2 mm	Alv. Ventil. L. pro Min., 37°
24. IV. bis 25. IV. Mischdiät (2 Bestimmungen)	37,9	3,50
26. IV. bis 30. IV. Mischdiät univ. Lichtbad (2 Bestimmungen)	38,3	3,58

Die alveolare CO_2-Spannung ist demnach von einer sogar sehr kräftigen Lichtbehandlung, die u. a. ein starkes und langdauerndes universelles Lichterythem hervorrief, gänzlich unbeeinflußt (38,3 gegen 37,9 mm); ebenso ist die Reizbarkeit des Atemzentrums unverändert geblieben (s. Fig. 5).

Es scheint mir, als seien wir jetzt dem Verständnis der sonst so rätselhaft aussehenden Lichtwirkung auf die Spannung der Blutkohlensäure etwas näher getreten. In den Fällen, wo — vielleicht durch die Nerven der entzündlich erweiterten Hautgefäße — eine Erhöhung der Reizbarkeit des Atemzen-

---

[1]) Diese Zeitschr. 39, 495, 1912.

[2]) Siehe Lindhard, Skand. Arch. f. Physiol. 26, 289, 1912 und Hasselbalch und Lindhard, ebenda 25, 381, 1911.

trums eingetreten ist, fällt die Spannung der Blutkohlensäure. Bleibt die Erregbarkeit des Zentrums unverändert, dann bleibt das Licht ohne Einfluß auf die alveolare CO_2-Spannung,

---

VII. Wir haben jetzt an der Hand zweier Beispiele — der Morphiumwirkung und der Lichtwirkung — gesehen, daß zur vollen Erklärung einer gegebenen Größe der alveolaren CO_2-Spannung die „Neutralitätstheorie" nicht immer ausreicht, sondern daß man mit der Möglichkeit einer veränderten Reizbarkeit des Atemzentrums rechnen muß.

Zu diesen zwei beispielsweise vorgeführten Fällen von gleichzeitiger Änderung der Reizbarkeit des Atemzentrums und der alveolaren CO_2-Spannung gesellt sich noch eine ganze Reihe. Bei der Gravidität habe ich[1]) für A. H. eine Steigerung der Reizbarkeit des Atemzentrums bis auf das Doppelte der Norm und einen Abfall der alveolaren CO_2-Spannung um 8 mm gefunden, ohne daß ich deswegen geneigt bin, in der Reizbarkeitsänderung den ausschließlichen Grund der Spannungserniedrigung suchen zu wollen.

Vielleicht spielt doch in der Physiologie wie auch in der Pathologie eine andere Genese der Erregbarkeitsänderungen eine weit größere Rolle als die bis jetzt behandelten. Bei einer Änderung des Sauerstoffdruckes des Blutes ändert sich die Reizbarkeit des Atemzentrums für CO_2 (Lindhard[2]) und ebenso für H-Ionen (Hasselbalch und Lundsgaard[3]) in der umgekehrten Richtung, und diese veränderte Reizbarkeit wird von einer Einstellung der alveolaren CO_2 auf ein entsprechendes Niveau begleitet, wie es Hasselbalch und Lindhard[4]) gelegentlich ihrer Untersuchungen über das Höhenklima zeigen konnten. Auch hier muß hervorgehoben werden, daß nicht die Erregbarkeitsänderungen allein für das Ergebnis verantwortlich gemacht werden können, sondern daß wahrscheinlicherweise Neutralitätsregulation und Reizbarkeit des Atemzentrums zusammenwirken, um den gegebenen Stand der alveolaren CO_2-Spannung hervorzubringen[5]).

---

[1]) Skand. Arch. f. Physiol. 27, 1912.
[2]) Journ. of Physiol. 42, 1911.
[3]) Skand. Arch. f. Physiol. 27, 1912. Vers. 7 bis 10.
[4]) Ebenda 25, 1911.
[5]) l. c. S. 397.

Die Auffassung, daß die Reizbarkeit des Atemzentrums von dem Sauerstoffdruck des Blutes abhängt, ist eigentlich schon 1870 von Hermann[1]) ausgesprochen worden, indem er zugibt, daß die CO_2 als alleiniger Regulator der Atmung betrachtet werden kann unter der Bedingung, daß die Wirksamkeit der CO_2 von dem O_2-Drucke abhängt. Wenn wir hier statt CO_2 die $C_{H^\cdot}$ des Blutes einsetzen, ist ja die von mir verfochtene Respirationstheorie formuliert worden, nur daß die „Wirksamkeit der CO_2" auch von anderen Umständen als eben von einer Änderung des O_2-Druckes abhängt.

Es finden sich in der Literatur übrigens recht viele Beobachtungen, die nur unter der Voraussetzung verständlich werden, daß der Sauerstoffdruck des Blutes die Reizbarkeit des Atemzentrums reguliert. Auf diese Beobachtungen[2]) gehe ich hier nicht des näheren ein, nur eine besonders überzeugende soll erwähnt werden. Leimdörfer[3]) fand in Durigs Laboratorium, daß die alveolare CO_2-Spannung, bei der nach Atemanhalten zwingend ein neuer Atemzug ausgelöst wird, durchschnittlich um ca. 8 mm höher lag, wenn Sauerstoff, als wenn atmosphärische Luft im voraus eingeatmet worden war. „Es ist möglich", äußert sich der Verfasser[4]), „daß darum, weil . . . die Gewebe, vor allem das Atemzentrum, im Zustande besserer Sauerstoffversorgung bzw. höheren Sauerstoffgehaltes sich befanden, diese für den Kohlensäurereiz weniger empfindlich waren[5])". Auch meines Erachtens kann das Versuchsergebnis kaum anders gedeutet werden als durch diese klare Abfassung der später von Lindhard und von mir verfochtenen Erregbarkeitstheorie. Es muß deshalb wundernehmen, daß Leimdörfer mit Porges, Novak und Markovici[6]) in mehreren Arbeiten von der alleinigen Geltung der Neutralitätstheorie ausgeht, indem er, ohne Rücksicht auf mögliche

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **3**, 8, 1870.

[2]) Über solche von Hill und Flack und von Loewy siehe Lindhard, Journ. of Physiol. **42**, 356, 1911.

[3]) Diese Zeitschr. **22**, 1909.

[4]) l. c. S. 62.

[5]) Von mir hervorgehoben.

[6]) Zeitschr. f. klin. Med. **73** und **75**; Wiener klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 40.

Änderungen der Erregbarkeit des Atemzentrums, in allen pathologischen Fällen, wo die alveolare CO_2-Spannung herabgesetzt ist, eine Produktion von abnormen, sauren Stoffwechselprodukten vermutet. Erst nach der Feststellung einer normalen Erregbarkeit des Atemzentrums oder einer normalen $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes kann eine „Ansäuerung“ des Blutes als alleinige Ursache der herabgesetzten Spannung der Blutkohlensäure angenommen werden. Da ja die Sauerstoffarmut des Atemzentrums dessen Erregbarkeit erhöht, ist in der Pathologie reichlich Gelegenheit vorhanden, auf erhöhte Erregbarkeit des Atemzentrums zu fahnden.

Die $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes ist nach Untersuchungen von Lundsgaard und mir[1]) innerhalb sehr weiter Grenzen von dem O_2-Druck unabhängig. Wenn wir demnach durch CO_2 experimentell die $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes um eine gegebene Größe erhöhen und dann bei hohem O_2-Gehalt der Lungenluft eine viel kleinere Lungenventilation beobachten als bei niedrigem, so muß es sich — weil ja in den beiden Fällen der Reiz derselbe ist — um eine Abnahme der Reizbarkeit durch den hohen O_2-Druck handeln.

Tatsächlich habe ich mit Lundsgaard[2]) bei Tierexperimenten durch gleichzeitige Messungen der $C_{H^{\cdot}}$ des arteriellen Blutes und der Lungenventilation diese Wirkung des Sauerstoffs konstatieren können.

Bei meinen normalen Versuchsindividuen habe ich nur recht bescheidene Verschiebungen der alveolaren CO_2-Spannung, bis zu 7 mm, experimentell erzeugt und doch in der Neutralitätsregulation und der Reizbarkeit des Atemzentrums einen besseren Einblick verschaffen können, als es mit den bisher angewandten Methoden möglich war. Durch die Messung der alveolaren CO_2-Spannung in solchen Fällen, wo diese um 10 bis 20 mm oder mehr gegen die Norm verändert ist, und durch die gleichzeitige Bestimmung der $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes bei dieser CO_2-Spannung wird es zweifelsohne möglich sein, in diese fundamentalen Fragen der Physiologie noch tiefer einzudringen.

[1]) Diese Zeitschr. 38, 88, 1912.

[2]) Skand. Arch. f. Physiol. 27, 1912. Vers. 7 bis 10.

Zusammenfassung.

1. Durch Diätänderungen kann man bei normalen Menschen die H-Ionenkonzentration des Harns innerhalb so weiter Grenzen experimentell variieren, daß alle bisher beobachteten „pathologischen" Größen innerhalb dieser Grenzen fallen.

2. Die alveolare CO_2-Spannung bewegt sich durch solche Eingriffe in umgekehrter Richtung wie die $C_{H^{\cdot}}$ des Harns. Dabei bleibt die Reizwirkung der CO_2 auf das Atemzentrum — die Reizbarkeit des Atemzentrums — unverändert. Es wird daraus gefolgert, daß unter allen Umständen die CO_2 durch ihren Säurecharakter auf das Atemzentrum inzitierend wirkt, und daß die Lungenventilation u. a. als Mittel dazu verwertet wird, eine Norm für die $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes aufrechtzuerhalten.

3. Die $C_{H^{\cdot}}$ des Blutes ist — ceteris paribus — um so höher, je größer die Konzentration der Blutkörperchen ist.

4. Die $C_{H^{\cdot}}$ des arteriellen Blutes ist nach der Reizbarkeit des Atemzentrums verschieden. Eine niedrige alveolare CO_2-Spannung kann einzig und allein einer großen Reizbarkeit des Zentrums zu verdanken sein.

5. Die zwei Faktoren: Neutralitätsregulation und Reizbarkeit des Atemzentrums, beherrschen zusammen die chemische Atmungsregulation, so daß die Größe der alveolaren CO_2-Spannung als Funktion der beiden Faktoren hervorgeht und nicht als physiologische Konstante betrachtet werden kann.

Ein Apparat zur Mikroblutgasanalyse und Mikrorespirometrie.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock).

(Eingegangen am 17. Oktober 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Der im folgenden näher zu beschreibende Apparat beruht auf einer Kombination der Prinzipien, die den gasanalytischen Methoden von Barcroft und Haldane einerseits und von Petterson andererseits zugrunde liegen (vgl. die zusammenfassenden Darstellungen von Fr. Müller[1]) und Bohr[2]). Wie die nebenstehende Figur zeigt, besteht der Apparat[3]) aus zwei Fläschchen, die die zuerst von Plesch (zit. nach Fr. Müller, l. c., S. 694) empfohlene birnförmige Gestalt besitzen. Diese kommunizieren miteinander durch eine, mit einer Millimeterteilung versehene Capillare, in der ein als Index dienendes Petroleumtröpfchen enthalten ist. Das rechts befindliche Fläschchen dient als Kompensationsgefäß, das zu Beginn der Analyse durch den darüber befindlichen Dreiweghahn mit der äußeren Atmosphäre in Verbindung gesetzt, durch Drehung des Hahnes dann von ihr abgesperrt wird, und nunmehr ein gänzlich abgeschlossenes Gasvolumen enthält, das bei gleicher Einstellung des Indextropfens stets das gleiche ist, unabhängig von etwaigen Änderungen des äußeren Druckes und der Außentemperatur. Das links befindliche Fläschchen ist das Analysengefäß, das das zu untersuchende Blut enthält, in welchem entweder der O_2-Gehalt nach der Haldaneschen Methode mit Ferricyankalium, oder

1) Fr. Müller, Biologische Gasanalyse. Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 3, 1. Hälfte, 1910.

2) Chr. Bohr, Die Gasarten des Blutes. Tigerstedts Handb. d. physiol. Methodik 2, 1. Hälfte, 1911.

3) Hergestellt von Dr. Geißler Nachf. Fr. Müller, Bonn.

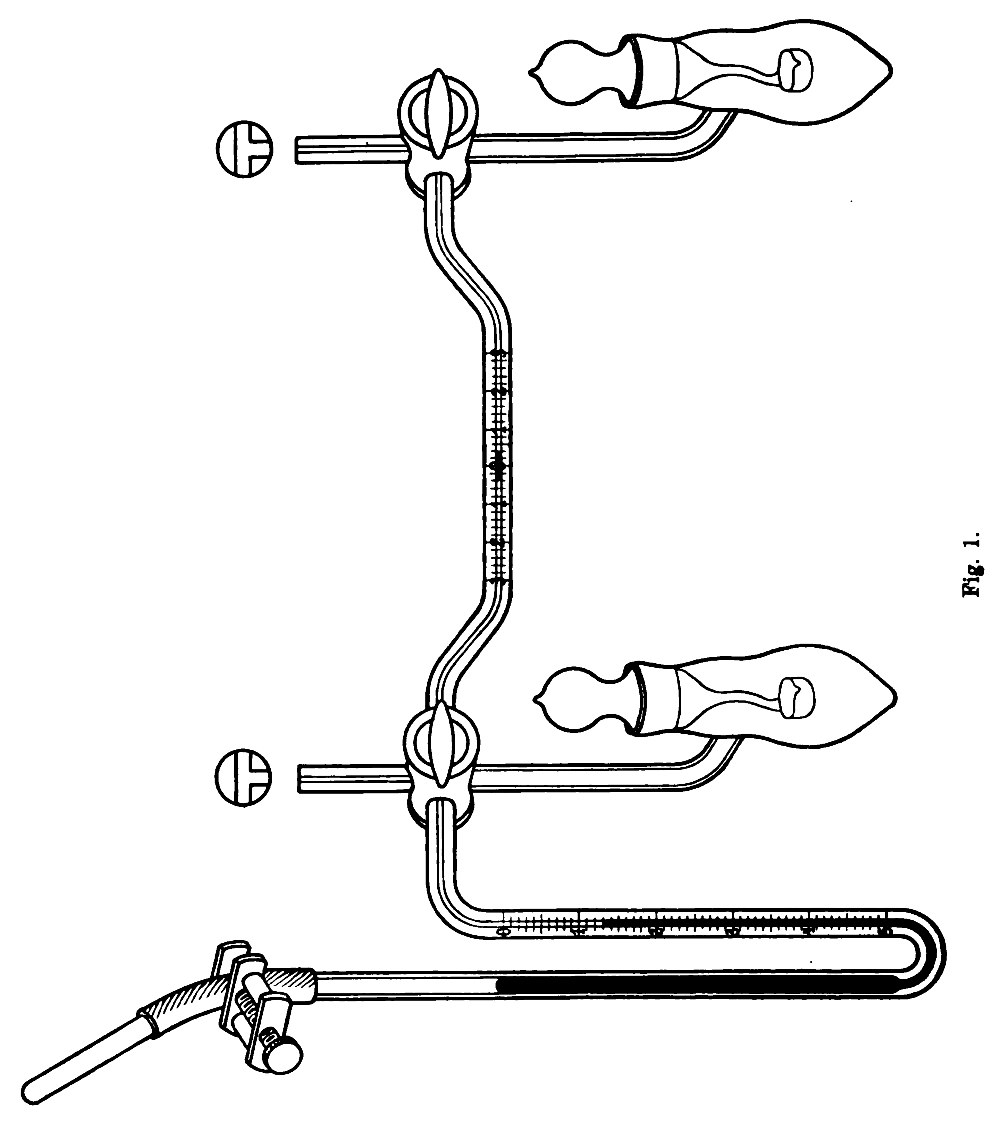


Fig. 1.

das O_2-Absorptionsvermögen durch einfaches Schütteln mit der Luft des Apparates bestimmt wird. Das zu Beginn des Versuches gleichfalls mit der Außenluft kommunizierende Analysengefäß steht nach entsprechender Hahndrehung einerseits mit der Indexcapillare, andererseits mit dem kleinen, seitlich angeschmolzenen Quecksilbermanometer in Verbindung, dessen dem Apparat zugekehrter Schenkel aus einer feinen, in Kubik-

millimeter geteilten Capillare besteht, während der andere, breitere Schenkel nach oben einen mit einem Glasstopfen verschlossenen Gummischlauch trägt. An diesem befindet sich eine Schraubklemme, die das Volumen des über dem Quecksilber befindlichen Luftraumes zu variieren und so das Quecksilber in der mit Teilung versehenen Capillare zu verschieben gestattet.

Der wesentliche Vorteil dieser Versuchsanordnung besteht nun darin, daß die ungeheure Empfindlichkeit des Pettersonschen Kompensationsverfahrens noch eine genaue Analyse sehr kleiner Blutmengen (bis zu 50 cmm) ermöglicht, und vor allem, daß die in der Analysenflasche eintretenden Volumänderungen direkt und unmittelbar abgelesen werden können, wodurch nicht bloß jegliche Berechnung, sondern auch die ganze schwierige und mühsame Kalibrierung aller Apparatteile, von deren Genauigkeit auch jene der Analysen bei den Barcroftschen Methoden abhängt, und alle damit verbundenen Fehlerquellen gänzlich in Fortfall kommen.

Der Gang der Analyse ist kurz geschildert der folgende: Um die Bedingungen möglichst gleich zu gestalten, werden beide Fläschchen des an einem Stativ befestigten Apparates in gleicher Weise mit Ammoniaklösung, die etwas Saponin enthält, besetzt (ca. 0,2 bis 0,4 ccm, eine Abmessung ist nicht nötig), dann wird mittels einer in Kubikmillimeter geteilten Pipette möglichst langsam und sorgfältig ein genau gemessenes Quantum (50 bis 150 cmm) des zu untersuchenden Blutes unter die Ammoniaklösung der Analysenflasche geschichtet; hierauf werden gleichzeitig auf beide Fläschchen die eingeschliffenen Glasstopfen aufgesetzt, an denen die Schälchen angeschmolzen sind, die gegebenenfalls das Ferricyankali enthalten. Durch leichtes Neigen des Apparates bei mit der Außenluft kommunizierenden Hähnen wird der Indextropfen an die gewünschte Stelle der Skala gebracht: hierauf wird der ganze Apparat bis an die Hähne (diese selbst bleiben an der Luft, desgleichen die Indexcapillare) in ein mit Spiegelglasplatten bekleidetes Wasserbad versenkt, dessen Inhalt durch ein Rührwerk oder durch den Luftstrom eines Wasserstrahlgebläses in kontinuierlicher Bewegung gehalten wird. Dann werden die Hähne so gestellt, daß die Fläschchen nurmehr mit der Indexcapillare und dem Hg-Manometer kommunizieren (vgl. die Figur).

Jetzt erfolgt durch Drehung der am Schlauch angebrachten Schraubklemme die genaue Einstellung des Indextropfens auf eine Stelle der Skala, und zwar so, daß der Meniscus des einen Tropfenrandes gerade einen bestimmten Teilstrich eben berührt; dann wird die Stellung des Quecksilbers in der Manometercapillare abgelesen. Die Einstellung des Tropfens sowohl wie die Ablesung erfolgen mit einer Lupe (im letzteren Falle durch die Wand des Wasserbades hindurch). Zur Ausschaltung einer parallaktischen Verschiebung sind beide Teilungen ringförmig herumgeführt, und die Ablesung erfolgt bei der Stellung, bei der der Teilkreis als eine haarscharfe Linie erscheint. Die Teilung der Manometerskala in Kubikmillimeter gestattet noch eine sichere Schätzung von 0,1 cmm. Vor jeder Ablesung muß der Indextropfen durch entsprechende Schraubendrehung genau in die Anfangsstellung zurückgebracht werden. Jetzt wird völliger Ausgleich der Druck- und Temperaturverhältnisse abgewartet; er ist erfolgt, wenn zwei in einem Intervall von 3 bis 5 Minuten vorgenommene Ablesungen den gleichen oder höchstens einen um 0,1 cmm verschiedenen Wert ergeben. Dann werden beide Hähne schräg gestellt, so daß sie sämtliche Teile des Apparates gegeneinander abschließen; der Apparat wird aus dem Wasser gehoben, von dem Stativ abgenommen und geschüttelt. Nach sorgfältigem Lackfarbenmachen des Blutes wird durch Neigen des Apparates die in den Schälchen beider Apparate enthaltene Ferricyankalilösung eingegossen und dann durch 3 bis 5 Minuten kräftig weitergeschüttelt. Ebensolange erfolgt das Schütteln bei der Absorptionsanalyse, bei der die Schälchen selbstredend leer bleiben. Dann wird der Apparat wieder in das Wasserbad versenkt und zunächst bloß der Hahn des Analysenfläschchens in die frühere Stellung gebracht, in welcher dieses mit Manometer- und Indexcapillare kommuniziert. Bei gleichzeitiger Öffnung beider Hähne könnte bei größeren Volumänderungen der Indextropfen leicht platzen. Es muß daher zunächst das Quecksilber durch entsprechende Schraubendrehung auf den Stand gebracht werden, der dem jetzt zu erwartenden Volumen beiläufig entspricht, und dann erst wird auch der Hahn des Kompensationsgefäßes geöffnet. Die noch eintretende Indexverschiebung wird wieder korrigiert und nun wiederum in Abständen von 3 bis 5 Minuten so lange abgelesen, bis der

Stand des Quecksilbers konstant geworden ist (bei richtigem Funktionieren des Apparates pflegt dies in 10 bis längstens 20 Minuten der Fall zu sein). Die Differenz der Ablesungen vor und nach erfolgter Sauerstoffentwicklung bzw. -absorption ergibt direkt die eingetretene Sauerstoffabgabe bzw. -aufnahme.

Nach jeder Analyse wird der Apparat sorgfältig gereinigt. So einfach alle Manipulationen sind, so erfordert der Apparat doch infolge seiner enormen Empfindlichkeit eine peinliche Sorgfalt der Handhabung. Auch dann kann es mitunter vorkommen, daß ohne erkennbare Ursache eine kontinuierliche Wanderung des Tropfens eintritt, so daß die Ablesungen keine konstanten Werte ergeben. Unter solchen Bedingungen gewonnene Resultate sind natürlich ganz unzuverlässig. Zu Beginn des Versuches sind die Fläschchen mit atmosphärischer Luft gefüllt, die ein wenig Kohlensäure enthält, die nach Verschluß des Apparates durch die Ammoniaklösung allmählich absorbiert wird. Darum ist bei Einfüllung des Blutes ein Ausatmen in den Apparat zu vermeiden. Ferner müssen, wie erwähnt, die beiden Glasstopfen gleichzeitig aufgesetzt werden, damit die CO_2-Absorption in beiden Fläschchen in annähernd gleicher Weise vor sich geht.

Über die Genauigkeit des Apparates geben zunächst die folgenden, mit der Ferricyanidmethode ausgeführten Doppelanalysen luftgesättigten, defibrinierten Blutes Aufschluß:

	Blutart	Menge cmm	O_2-Gehalt Vol.-%	Größte Differenz Vol.-%
I.	Rind	100	14,8 14,2	0,6
II.	„	100	16,0 16,7 16,5	0,7
III.	„	100	18,4 18,0	0,4
IV.	„	100	17,7 17,3	0,4
V.	Schwein	100	15,7 15,1	0,6
VI.	„	50	17,6 17,2 17,9	0,7

Die relative Genauigkeit dieser Analysen ist etwa die gleiche wie bei jenen der 10 bis 20fachen Blutmenge im Barcroft-Haldaneschen Apparat (vgl. Fr. Müller, l. c.). Noch viel größer ist die Übereinstimmung von Doppelanalysen, wenn statt des O_2-Gehaltes das O_2-Absorptionsvermögen eines mehr oder minder venösen Blutes durch einfaches Schütteln mit Luft bestimmt wird. Hier reduziert sich die Differenz im wesentlichen auf die Fehler der Ablesung, wie die folgenden Beispiele zeigen (die zum Teil sehr hohen O_2-Absorptionen erklären sich wohl durch die Anwesenheit oxydabler Substanzen in dem stark reduzierten, meist leicht faulendem Blut):

	Blutart	Menge in cmm	O-Aufnahme in cmm	Differenz in cmm
I.	Schwein	100	21,6 21,8	0,2
II.	"	50	13,9 14,1	0,2
III.	Rind	100	13,7 13,8	0,1
IV.	"	100	16,2 16,2	0,0

Zur Prüfung der absoluten Genauigkeit des Apparates wurden Vergleichsanalysen mit der Pumpe ausgeführt. Es ergab sich, daß dort, wo durch die Ferricyanidmethode tatsächlich der ganze Sauerstoff frei gemacht wurde (s. u.), auch die Übereinstimmung eine befriedigende war, wie die beiden folgenden Analysen defibrinierten, mit Luft gesättigten Rinderblutes zeigen:

	O_2-Gehalt in Vol.-%		Differenz in Vol.-%
	Ferricyanid	Pumpe	
I.	14,7	14,3	+ 0,3
II.	18,4 18,0 } 18,2	17,4 17,5 } 17,45	+ 0,75

In anderen Versuchen aber ergaben die mit den beiden Methoden gewonnenen Resultate völlig abweichende Werte.

Schon Haldane[1]) hat gelegentlich ein (in seinen Versuchen allerdings nur geringfügiges) Zurückbleiben der mit der Ferricyanidmethode gewonnenen Werte hinter den Pumpenwerten beobachtet, das er auf bakterielle O_2-Zehrung zurückführte. Aber später hat Fr. Müller[2]) in einzelnen Versuchen an ganz frischem Blut und bei untereinander gut übereinstimmenden Doppelanalysen so große Differenzen bei beiden Methoden beobachtet, daß diese Erklärung völlig ausscheiden mußte. Müller nimmt daher an, daß im Blut mitunter oxydable Stoffe vorhanden sind, die bei der Methämoglobinbildung den Sauerstoff in statu nascendi verbrauchen. Nach Müller[3]) sind solche Differenzen, die im arteriellen und venösen Blut gleichmäßig auftreten, besonders beim Hunde- und Katzenblut zu beobachten. In manchen Fällen findet sich, wie Müller (l. c. S. 684) angibt, bei Hunde- und Menschenblut eine große Neigung, den ausgetriebenen Sauerstoff wieder aufzunehmen, so daß man keine scharfen Endresultate erhält. Ich habe dieses Verhalten auch bei Katzenblut beobachtet und für Kaninchenblut, für das Erfahrungen mit der Ferricyanidmethode bisher nicht vorzuliegen scheinen, diese zum mindesten in der vorliegenden Form überhaupt völlig unbrauchbar gefunden (sowohl für defibriniertes wie für mit Hirudin versetztes Blut). Aber auch bei Rinder- und Schweineblut, die im allgemeinen ganz präzise und untereinander vorzüglich übereinstimmende Resultate ergeben, ließ sich mitunter ein ganz enormes Zurückbleiben hinter den Pumpenwerten beobachten. Um nun die Genauigkeit des Apparates unabhängig von diesen Fehlerquellen der Ferricyanidmethode zu prüfen, wurde der folgende Weg eingeschlagen: Statt der absoluten Werte des O_2-Gehaltes wurde die für Gaswechselversuche ja besonders wichtige Differenz des O_2-Gehaltes von arteriellem und venösem Blut ermittelt, und zwar einerseits mit der Pumpe, andererseits entweder mit der Ferricyanidmethode oder durch Bestimmung

---

[1]) J. Haldane, The ferricyanide method of determining the oxygen capacity of blood. Journ. of Physiol. 25, 295, 1899/00.

[2]) Fr. Müller, Über die „Ferricyanid-Methode" zur Bestimmung des Sauerstoffs im Blut ohne Blutgaspumpe. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 103, 541, 1904.

[3]) Fr. Müller, Biologische Gasanalyse, l. c., S. 697.

des O_2-Absorptionsvermögens des Blutes. Die Resultate der drei in dieser Weise angestellten Versuche (I mit defibriniertem Kaninchenblut, II und III mit defibriniertem Schweineblut) gibt die folgende Tabelle:

	Methode	Blutmenge in ccm	O_2-Gehalt in Vol.-% luftgesättigt	O_2-Gehalt in Vol.-% reduz. *)	O_2-Absorption in Vol.-% luftgesättigt	O_2-Absorption in Vol.-% reduz. *)	Differenz der O_2-Gehalte	Differenz zwischen Pumpe u. Apparat in Vol.-%
I.	Pumpe . .	4,0	14,9	4,0	—	—	10,9	1,0
	Absorption .	0,1	—	—	3,6	13,5	9,9	
II.	Pumpe . .	4,0	22,6	14,5	—	—	8,1	0,7
	Ferricyanid	0,1	16,8	8,0	—	—	8,8	0,9
	Absorption .	0,1	—	—	1,6	10,6	9,0	
III.	Pumpe . .	4,0	16,6	12,4	—	—	4,2	0,0
	Ferricyanid	0,1	12,8	8,6	—	—	4,2	

*) In I und II durch längeres Stehen des Blutes, in III durch Sättigung mit einem O-armen Gasgemisch.

Diese Versuche[1]) zeigen, daß, obwohl es sich um Differenzwerte handelt, bei denen die Fehler sich unter Umständen summieren können, die größte hier beobachtete Differenz 1 Vol.-% nicht übersteigt, eine völlig befriedigende Genauigkeit, zumal, wenn man bedenkt, daß bei der verwendeten Blutmenge 1 Vol.-% einem absoluten Wert von nur 1 cmm Gas entspricht. Die Versuche zeigen weiter, daß, wie schon erwähnt, die Fehler der Ferricyanidmethode das arterielle und das venöse Blut in gleicher Weise betreffen und von dem O_2-Gehalt des Blutes unabhängig sind, so daß vergleichende Bestimmungen korrekte Resultate ergeben können, auch wenn die absoluten Werte ganz falsch sind. Wo es auf diese ankommt, ist die Anstellung von Pumpenanalysen unbedingt erforderlich[2]).

[1]) Bei gleichzeitiger Verwendung von zwei Apparaten kann so die Barcroftsche Differentialmethode (Differential method of blood-gas analysis. Journ. of Physiol. 37, 12, 1908) unter Vermeidung ihrer Hauptschwierigkeit, der Eichung, nachgeahmt werden.

[2]) Es könnte sein, daß die ihrer Natur nach nicht näher bekannten Fehlerquellen, welche die Ferricyanidmethode bei manchem Blut zeigt, bei Verwendung so kleiner Blutmengen in besonders eklatanter Weise hervortreten. Jedenfalls ist vor jeder unnötigen Anwendung der Ferri-

Für die Bestimmung der Kohlensäure, für welche die chemische Methode ja überhaupt viel ungenauer ist, habe ich bei Verwendung so kleiner Blutmengen keine brauchbaren Resultate erzielen können.

Der Apparat hat die kleinen Dimensionen erhalten, da es sich mir eben um die Gewinnung einer einfachen Methode zur Analyse sehr kleiner Blutmengen handelte. Es liegt jedoch auf der Hand, daß das ihm zugrunde liegende Prinzip mit gleichem Erfolg und Vorteil auch für die Analyse größerer

---

cyanidmethode zu warnen, um so mehr, als sie durch eine Kombination von Pumpen- und Absorptionsanalysen in den meisten Fällen zu umgehen sein dürfte. Schon früher habe ich (zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere, diese Zeitschr. **19**, 384, 1909) darauf hingewiesen, daß die Auspumpung des Blutes auch bei Verwendung nur weniger Kubikzentimeter sehr gut übereinstimmende Resultate liefert, sofern man über eine gute Pumpe und einen mit capillarer Meßbürette versehenen Analysenapparat verfügt. Überaus zweckmäßig andererseits wegen des Mangels an Fehlerquellen und der raschen Durchführbarkeit erscheint die Methode der Absorptionsanalyse, die in der Messung der O_2-Menge besteht, die das Blut bei seiner Luftsättigung noch aufzunehmen vermag. Dieses Verfahren, das zuerst von Barcroft bei seiner Differentialmethode (l. c.) und später von Warburg (Über Beeinflussung der Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen an roten Blutkörperchen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 452, 1910) zur Untersuchung der O_2-Atmung der Blutkörperchen verwendet wurde, ist nicht bloß an sich überall dort völlig ausreichend, wo es, wie bei Gaswechselversuchen, nur auf die Differenz der O_2-Gehalte ankommt, sondern dürfte noch einer weitergehenden Anwendung fähig sein; denn wenn man die Methode „eicht", indem man zu einer gemessenen O_2-Absorption durch eine Pumpenanalyse den zugehörigen O_2-Gehalt des betreffenden Blutes bestimmt, so kann jeder andere O_2-Gehalt des Blutes aus der Absorptionsanalyse durch einfache Subtraktion gefunden werden, selbstredend unter der Voraussetzung, daß die O_2-Kapazität des Blutes unter den betreffenden Versuchsbedingungen konstant bleibt. Zu berücksichtigen ist hierbei, was auch aus den oben angeführten Versuchen hervorgeht, daß bei diesem Verfahren das O_2-Absorptionsvermögen luftgesättigten Blutes nicht etwa ohne weiteres gleich Null gesetzt werden darf. Denn die stark verdünnte ammoniakalische Blutlösung wird auch bei völliger Luftsättigung des unverdünnten Blutes meist noch Sauerstoff absorbieren, sei es infolge der Verminderung des CO_2-Druckes, sei es infolge eines direkten Einflusses der Verdünnung auf die O_2-Kapazität des Hämoglobins (vgl. W. Manchot, Untersuchungen über die Sauerstoffbindung im Blut. Liebigs Ann. **370**, 341, 1910, und: Über das Gasbindungsvermögen des Blutfarbstoffes, diese Zeitschr. **43**, 438, 1912).

Blutmengen verwendbar ist. Da die Genauigkeit der Einstellung des Indextropfens von der Größe des Apparates weitgehend unabhängig ist, so muß mit zunehmender Blutmenge die Exaktheit der Analyse bedeutend steigen, und z. B. bei Verwendung etwas größerer Fläschchen und eines größeren Manometers, das statt in 0,001 in 0,01 ccm geteilt ist, die O_2- und CO_2-Analyse von 1 ccm Blut mit größerer Genauigkeit durchführbar sein, als dies mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden möglich ist.

Schließlich sei erwähnt, daß der Apparat in der geschilderten Form auch eine zweckmäßige Modifikation des Differenzmikrorespirometers darstellt, das von Thunberg[1]) zu Demonstrationszwecken ersonnen, von mir[2]) zu quantitativen Untersuchungen verwendet wurde. Durch die Verbindung des Atmungsgefäßes mit dem Quecksilbermanometer wird auch hier eine direkte Ablesung der eingetretenen Volumänderung unter Ausschaltung jeglicher Kalibrierung und Berechnung möglich, und es kommen alle Fehlerquellen in Fortfall, die etwa durch ein Adhärieren des Tropfens an der Capillarwand entstehen können. Wenn es sich um Untersuchung des Gaswechsels in verschiedenen Gasarten handelt, brauchen die beiden Fläschchen von entsprechend abgeänderter Gestalt und Größe nur mit je einem Gaszuleitungsrohr verbunden zu werden, welchem am besten die kürzlich von Widmark[3]) beschriebene Form zu geben ist.

---

[1]) T. Thunberg, Eine einfache Anordnung, um die Sauerstoffzehrung kleiner Organismen oder Organe zu demonstrieren. Centralbl. f. Physiol. **19**, 308, 1905.

[2]) H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Zeitschr. f. allg. Physiol. **6**, 315, 1907.

[3]) E. M. P. Widmark, Über die Handhabung des Thunberg-Wintersteinschen Mikrorespirometers usw. Skandin. Arch. f. Physiol. **24**, 321, 1911.

Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

Giacomo Pighini.

IV. Mitteilung.

Beitrag zur chemischen Zusammensetzung des Gehirns bei der progressiven Paralyse.

Von

Domenico Carbone und Giacomo Pighini.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium des Psychiatrischen Instituts in Reggio-Emilia).

(Eingegangen am 12. Oktober 1912.)

Wir sind noch weit davon entfernt, spezifische analytische Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung zwischen einem Organ oder einem bestimmten Teile eines gesunden Organs und demselben Organ oder einem Teile desselben, das von einer bestimmten Krankheit befallen ist, feststellen zu können. Indessen lassen uns die wunderbaren Fortschritte der histologischen Morphologie und die jüngsten wichtigen Errungenschaften der mikrochemischen Histologie die begründete Hoffnung hegen, daß dort, wo mittels Beizung, spezifischer Färbung, größerer oder geringerer Löslichkeit, durch Polarisation usw. wesentliche Unterschiede vom Normalen gefunden worden sind, auch die chemische Analyse gleichfalls wesentliche und spezifische Unterschiede erkennen lassen wird. Wir sind überzeugt, daß neben den die Modifikationen der feinen Struktur der morphologischen Elemente des Gewebes verfolgenden Forschungen die Untersuchungen der elementaren chemischen Zusammensetzung der Gewebe selbst in hervorragendem Maße dazu beitragen müssen, hinsichtlich der Veränderungen, die das Organ infolge der pathogenen Einwirkung erleidet, sowie hinsichtlich

des Wesens des Krankheitsprozesses, das erwünschte Licht zu verbreiten. Ehe wir aber dieses Ziel, das höchste Ziel der Pathologie, erreichen, bedarf es einer langen vorbereitenden Arbeit der physiologischen und pathologischen Chemie; wir brauchen genaue Methoden für die systematische Untersuchung, die wir vergleichend bei den normalen und den veränderten Geweben anwenden können. Bezüglich der Chemie des Gehirns — mit der wir uns hier speziell beschäftigen — ist in diesen letzten Jahren eine große Strecke Weges zurückgelegt worden, und die Zukunft verspricht noch weitere schöne Resultate, wenn, wie es den Anschein hat, die Untersuchungen auf diesem Gebiete immer weiter ausgedehnt werden und ebenso erfolgreich sind wie bisher. Von der klassischen Arbeit Thudichums bis zu den neueren Untersuchungen von Fränkel ist die Hirnchemie auf immer festerer Grundlage aufgebaut worden, so daß sie heutzutage dem Forscher sichere analytische Daten und, was vor allem wichtig ist, praktische und genügend genaue Untersuchungsmethoden darzubieten imstande ist.

Da das Nervengewebe sehr reich an Lipoidstoffen ist, haben die Verfahren der fraktionierten Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln in der Praxis die besten Resultate ergeben; sie gestatten uns, verschiedene Bestandteile der einzelnen Extrakte zu analysieren, zu identifizieren und ihren Prozentgehalt im Vergleich mit der ganzen Masse festzustellen. Indem wir die Literatur des Themas nur flüchtig streifen, da die Erwähnung aller Einzelheiten uns zu weit führen würde, wollen wir hier nur auf zwei von den in jüngster Zeit veröffentlichten Methoden hinweisen, die unserer Ansicht nach die wichtigsten und für eine systematische Untersuchung der Chemie des normalen und pathologischen Gehirns am besten geeigneten sind: die Methoden von Waldemar Koch und von Sigmund Fränkel.

Das von Koch im Jahre 1904 vorgeschlagene Verfahren[1]), das dann in ausgedehntem Maße im Zusammenarbeiten mit S. A. Mann[2]) bei der Analyse von 20 Fällen angewendet wurde und die Gehirne von Normalen, Dementia praecox-Kranken und Paralytikern umfaßten, besteht im wesentlichen in der Trennung der Hirnbestandteile in 4 Teile: 1. Teil, löslich in Alkohol und unlöslich in angesäuertem

[1]) Amer. Journ. of Physiol. **11**, 303, 1904.

[2]) W. Koch and S. A. Mann, A chemical study of the brain in healthy and diseased conditions. Arch. of Neurol. and Psychol. **1910**.

chloroformhaltigem Wasser, die Lipoide umfassend; 2. Teil, löslich sowohl in Alkohol wie in angesäuertem chloroformhaltigem Wasser, einige Extraktivstoffe umfassend; 3. Teil, unlöslich in Alkohol, löslich in Wasser, die anderen Extraktivstoffe umfassend; 4. Teil, unlöslich in Alkohol, unlöslich in Wasser, die Eiweißstoffe umfassend. Diese Methode eignet sich vor allem gut für die fraktionierte Extraktion der schwefel- und phosphorhaltigen Lipoide und für die Bestimmung des Prozentgehaltes des an die verschiedenen Bruchstücke gebundenen Schwefels und Phosphors; lipoider S und P, Extraktiv-S und -P, Eiweiß-S und -P. Koch und Mann konnten bei Anwendung der Methode feststellen, daß in 9 Gehirnen von Dementia praecox-Kranken eine ausgeprägte Verminderung des Schwefels wahrzunehmen war, der im Teil 2 enthalten ist, und welcher bei verlängertem Sieden mit Salzsäure keine Schwefelsäure ergab, wie auch keine Sulfide beim Kochen mit Alkali und Bleiacetat — der sog. Neutralschwefel —, während sie in 5 Gehirnen von progressiver Paralyse keine Verminderung des Neutralschwefels fanden, sondern vielmehr eine Tendenz zur Verminderung des Lipoidphosphors (Teil 1), „indicating — wie die Autoren sagen — a greater destruction of the lecithins". Diese Angaben sind ohne Zweifel interessant, aber sie lassen uns im Dunkeln bezüglich anderer wichtiger Bestandteile, die in der Hirnsubstanz gefunden und in jüngster Zeit beschrieben worden sind, und die mit der von den englischen Autoren befolgten Methode nicht deutlich nachzuweisen sind. Dafür eignet sich dagegen die Fränkelsche Methode gut, die schon beim Studium der Lipoide anderer Organe erprobt und dann mit bemerkenswerten Resultaten bei der Chemie des Gehirns angewendet wurde. Während die Kochsche Methode sich besser für die Untersuchung der sog. Extraktivstoffe und für die Bestimmung des Prozentgehaltes an gebundenem und nicht gebundenem S und P eignet, paßt die Fränkelsche Methode besser als irgend eine andere für die Untersuchung und Identifizierung der verschiedenen Lipoidstoffe, die den größten Prozentsatz der Hirnsubstanz repräsentieren. Mithin würden die beiden Methoden sich in sehr geeigneter Weise bei einem vollständigen Studium der Gehirnchemie ergänzen.

Das von Fränkel befolgte Verfahren besteht darin, daß die gut von den weichen Hirnhäuten und Gefäßen befreite und durch einen Fleischzerreiber gegangene Hirnmasse erst mit Aceton und Petroläther mit niedrigem Siedepunkt (unterhalb 55°), dann mit Benzol, Alkohol und Äther bruchstückweise extrahiert wird. Was die Beschreibung der Methode anbelangt, verweisen wir den Leser auf die zahlreichen von Fränkel und seinen Schülern[1]) veröffentlichten Monographien; hier

[1]) S. Fränkel, Gehirnchemie. Ergebn. d. Physiol. 8, 212, 1909. — Darstellung von Lipoiden aus Gehirn und anderen Geweben. — Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 1911. — S. Fränkel und K. Linnert, Vergleichend-chemische Gehirnuntersuchungen. Diese Zeitschr. 26, 1 u. 2, 1910. — S. Fränkel und L. Dimitz, Die chemische Zusammensetzung des Rückenmarks. Diese Zeitschr. 28, 3 bis 4, 1910.

müssen wir nur erwähnen, daß sie gestattet, nach und nach in der zu bearbeitenden Masse die Prozentmengen an Wasser, festen Stoffen, Cholesterin, Leukopolyin, Kephalin, gesättigten Phosphatiden — Protagonen der Deutschen, Sphingogalactosid, Sphingomyelin, Phosphor-Sulfatiden usw. von Thudichum, Fränkel usw. — und Eiweißstoffe, die sie zusammensetzen, festzustellen. Man kann so bezüglich eines jeden Bruchteils und eines jeden einzelnen Bestandteils Untersuchungen anstellen und beurteilen, ob Unterschiede zwischen der Norm und dem Pathologischen vorhanden sind.

Auf der festen Grundlage experimenteller Untersuchungen über das Gehirn des Menschen und anderer — vergleichend studierter — Säuger, die Fränkel und seine Schule mit ihrer Methode durchführten, und der viel versprechenden und sehr interessanten Resultate, welche Allers[1]) erhielt, indem er diese Methode auf die Chemie des senilen Gehirns übertrug, haben wir unsere Untersuchungen über das Gehirn der Paralytiker unternommen; dabei hielten wir uns genau an das Verfahren Fränkels, das wir nur unwesentlich in einigen Einzelheiten modifizierten, wenn die Erfordernisse der Untersuchung und die uns in unserem Laboratorium zur Verfügung stehenden Mittel dies verlangten. Bei dieser ersten Reihe von Untersuchungen, die wir veröffentlichen, haben wir unser Studium auf die Produkte der beiden ersten Extrakte der Hirnmasse, die des Acetons und des Petroläthers, beschränkt. Mit den Untersuchungen über die Produkte der aufeinander folgenden Extraktionen mit Benzol, absolutem Alkohol und Äther ist schon begonnen worden und wir werden sie in der Folge veröffentlichen.

Bei der Extrahierung mit kaltem und warmem Aceton wird nach Fränkel in der festen Masse die Menge — in Prozenten — des Rohcholesterins bestimmt und ein ungesättigtes Phosphatid — ein Dekaaminodiphosphatid — isoliert, das schon von H. Elias[2]) eingehender studiert wurde und, weil es gleichmäßig in der weißen und in der grauen Substanz verteilt ist, Leukopolyin genannt worden ist. Aus dem Petroläther-Extrakt wird das Kephalin isoliert und identifiziert, ein schon von Thudichum studiertes und beschriebenes Mono-

---

[1]) R. Allers, Beiträge zur Chemie des senilen Gehirns. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. 5, 467, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. 28, 3 bis 4, 320, 1910.

aminomonophosphatid, das sich nach dem Fränkelschen Verfahren leicht von den anderen ungesättigten Phosphatiden trennen läßt, weil es, von diesen verschieden, sich mittels Alkohol aus beiden Lösungen in Äther und in Petroläther niederschlagen läßt. Das Kephalin repräsentiert im Gehirn den größten Teil seiner Gesamtlipoide und hat nach Fränkel eine große physiologische Bedeutung für die inneren Oxydationsprozesse der Gewebe[1]). Nach Dimitz[2]) stellt es ein Gemisch aus zwei ähnlichen Kephalinen dar, dem Palmityl- und dem Stearylkephalin, in dem das Palmitylkephalin vorherrscht; sein optisches Verhalten wird — wie beim Lecithin — durch die Gruppe der Glycerinphosphorsäure, die es enthält, bewirkt.

Wir haben in den beiden Extrakten, dem Aceton- und Petrolätherextrakt, nach den obenerwähnten Stoffen gesucht, indem wir für jedes Gehirn den Prozentgehalt an Wasser und Trockensubstanzen und bei den letzteren den Prozentgehalt an Acetonextrakt, Rohcholesterin und Petrolätherextrakt abschätzten. Auch unterließen wir es nicht, nachzuforschen, ob andere Stoffe, außer den beim Normalen beschriebenen, in die von uns bearbeiteten Extrakte übergingen.

Experimenteller Teil.

Wir haben die Gehirne von 5 Fällen von progressiver Paralyse und vergleichend mit diesen 1 Fall von Dementia praecox paranoides und 1 Fall eines psychisch normalen Individuums, das mit 61 Jahren an Krebs starb, untersucht.

1. Fall. Napoleone Soliani, 52 Jahre alt, in unserer Anstalt am 15. Januar 1912 an Marasmus paralyticus gestorben. Klinische Diagnose: progressive Paralyse. Wassermannsche Reaktion im Oktober 1911 am Blute vorgenommen: positiv. Autopsie: Meningoencephalitis chronica, Atrophie der Hirnwindungen. Gewicht des Gehirns 1380 g.

2. Fall. Luigi Cioni, 43 Jahre alt, in unserer Anstalt am 22. Januar 1912 gestorben. Wassermannsche Reaktion im Blute, die in der letzten Zeit mehrmals vorgenommen wurde, positiv. Klinische Diagnose: progressive Paralyse. Todesursache: Ictus apoplectiformis. Autopsie: Reichliche Flüssigkeit unter die Dura, Meningoencephalitis älteren Datums, Verdichtung der Pia, ausgeprägte Atrophie und Abplattung der Windungen, Erweiterung der Ventrikel. Gewicht des Gehirns 1200 g.

---

[1]) S. Fränkel u. L. Dimitz, Wiener klin. Wochenschr. **1909**, S. 51.

[2]) L. Dimitz, Über die Spaltungsprodukte des Kephalins. Diese Zeitschr. **21**, 337, 1909.

3. Fall. Maria Cavazzoni, 41 Jahre alt, in der Anstalt gestorben am 15. März 1912. Die im März 1911 am Liquor cerebrospinalis vorgenommene Wassermannsche Reaktion fiel positiv aus. Klinische Diagnose: progressive Paralyse in langsamer Form. Todesursache: Septikämie infolge Decubitus. Autopsie: Mäßige Menge subduraler Flüssigkeit, spärliche Flecken von Verdunkelung auf den Meningen, Windungen leicht atrophisch, Ventrikel etwas erweitert. Gewicht des Gehirns 1194 g.

4. Fall. Edoardo Bocigalupo, 42 Jahre alt, in der Irrenanstalt Quarto (Genua) am 9. Mai 1912 gestorben. Klinische Diagnose: progressive Paralyse. Anatomische Diagnose: Marasmus paralyticus mit chronischer Meningoencephalitis. Gewicht des Gehirns 1430 g.

5. Fall. Michele Barbero, 47 Jahre alt, starb in der Irrenanstalt Cogoleto (Genua) am 12. Juni 1912. Klinische Diagnose: progressive Paralyse (vorausgegangene Syphilis konstatiert). Anatomische Diagnose: chronische Meningoencephalitis, ausgesprochene Atrophie der Windungen. Gewicht des Gehirns 1290 g.

6. Fall. Augusto Marri, 36 Jahre alt, gestorben in unserer Anstalt am 9. März 1912. Klinische Diagnose: Dementia praecox paranoica. Todesursache: akute Pneumonie. Makroskopische Läsionen des Gehirns: Kein, ausgenommen etwas subpiales Ödem. Gewicht des Gehirns 1350 g.

7. Fall. Geminiano Luppi, 61 Jahre alt, starb im Spital zu Modena am 5. Juli 1912. Klinische und anatomische Diagnose: Pyloruscarcinom, mit Metastasen an den retroperitonealen und Leberdrüsen. Todesursache: carcinomatöses Marasma. Makroskopische Gehirnläsionen: Ödem und leichte Erweiterung der Ventrikel; die Hirnoberfläche und die Meningen erscheinen völlig normal. Gewicht des Gehirns 1295 g.

Technik.

Die Hirnmasse wurde der Leiche ca. 12 Stunden nach dem Tode entnommen und sofort hergerichtet. Herr Dr. Gorrieri von den Irrenanstalten zu Genua hatte die Liebenswürdigkeit, die ersten Operationen: Entnahme des Gehirns, Abwaschen, Zerreiben, Wiegen und Eintauchen in Aceton beim 4. und 5. Gehirn auszuführen, wofür wir ihm unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Das vorher gewogene Gehirn wurde von den Meningen befreit, indem gleichzeitig Kleinhirn und Bulbus davon abgetrennt wurden. Von dem auf diese Weise bloßgelegten Gehirn wurden Blut und Liquor cerebrospinalis unter einem dünnen Strahl tropfenden Wasser abgewaschen, worauf es mit einem Fleischzerreiber fein zerrieben wurde. Die so vorbereitete Masse wurde gewogen und dann in kaltes Aceton gelegt. Nach 2 bis

4 Tagen wurde durch ein Faltenpapier filtriert, hierauf die Masse neuerdings mit kochendem Aceton extrahiert, das wir im Kontakt mit dem Gehirn sich abkühlen ließen; alsdann wurde durch Papier filtriert. Die beiden Extrakte wurden vereinigt. (Erstes Acetonextrakt.) Die Hirnmasse wurde alsdann gründlich mit Aceton in einem großen Soxhletschen Apparat nochmals extrahiert. (Zweites Acetonextrakt.) Die feste Substanz wurde dann im Trockenschrank bei 60° bis 65° bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Nach dem Wiegen wurde die Masse einer neuen gründlichen Extrahierung mit unter 55° kochendem Petroläther ca. 48 Stunden lang unterzogen (Petrolätherextrakt) und endlich bis zu konstantem Gewicht im Trockenschrank bei 60° getrocknet.

Acetonextrakte.

Erstes Acetonextrakt: Der größte Teil des Acetons wird unter reduziertem Druck daraus destilliert, dann wird es im Wasserbad vollständig verdampft und endlich im Brutschrank bis zur Trockne bei 60° bis 65° auf konstantes Gewicht gebracht. (Erster Acetonrückstand.) Dieser Rückstand wird mit kochendem Aceton wieder aufgenommen (nur bei den Hirnen Cioni (2) und Cavazzoni (3) wurde er mit kochendem 85%igem Alkohol aufgenommen); die Flüssigkeit wird verdunstet[1]) und der Rückstand mit kochendem 85%igem Alkohol wieder aufgenommen und weiterhin behandelt, wie folgt. (Flüssigkeit A.) Sowohl das kochende reine Aceton, wie auch der kochende 85%ige Alkohol extrahieren jedoch nur einen Teil des erwähnten ersten Acetonextraktes; es bleibt nämlich ein Teil davon stets ungelöst, weil er in diesen Lösungsmitteln unlöslich ist. Dieser Bruchteil besteht aus einer rotbraunen Substanz, die bald ein trockenes und undurchsichtiges, bald ein mehr öliges und durchsichtiges Aussehen zeigt, und namentlich in der Wärme einen Geruch von Fleischextrakt ausströmt (albuminoide Substanz). Aus einigen an verschiedenen Proben dieser Masse ausgeführten Versuchen ergab sich, daß sie viel Stickstoff enthielt, die Biuret- und die Xanthoproteinreaktion ergab, mit Natronlauge gekocht H_2S frei-

[1]) In den Fällen 1 und 6 wurde sie direkt dem zweiten Acetonextrakt zugesetzt.

machte und die Acrolein-Reaktion (Reaktion Ganassini) nicht ergab; dies alles läßt vermuten, daß es sich eben um ein Gemisch von Eiweißstoffen handelt, die im Wasser gelöst und mit ihm in das erste Acetonextrakt übergegangen sind (die Menge dieser Stoffe schwankte bei jedem Falle zwischen 3 und 12 g).

Die Lösung in kochendem 85%igem Alkohol des ersten Rückstandes — Flüssigkeit A — wurde 1 bis 2 Tage lang sich selbst überlassen; auf diese Weise trennt sich infolge der Abkühlung das Cholesterin davon ab, das, durch Filtration mittels Pumpe abgetrennt, auf dem Filter mit kaltem 85%igem Alkohol gewaschen und im Brutschrank bei 60° bis zu konstantem Gewicht getrocknet wird (Rohcholesterin). Das alkoholische Filtrat — Flüssigkeit B — wird im Wasserbad bei gewöhnlichem Druck und mäßiger Temperatur bis zur Entfernung des Alkohols verdunstet. Nach dem Abkühlen und 24stündiger Ruhe fällt eine rötliche klebrige Substanz aus, die auf dem Filter gesammelt wird.

Dem wässerigen Filtrat — Flüssigkeit C — wird eine gesättigte alkoholische Cadmiumchloridlösung zugesetzt; wenn sich ein Niederschlag zeigt — den wir Substanz x nennen wollen und von dem wir im folgenden sprechen werden —, so läßt man ihn sich absetzen und filtriert dann (Flüssigkeit D).

Die rötliche, klebrige Substanz, die sich infolge des Verdunstens des Alkohols aus der Flüssigkeit B niedergeschlagen hatte, wird in einem Überschuß von absolutem Alkohol vollständig aufgelöst; der Lösung setzt man alsdann eine alkoholische gesättigte Cadmiumchloridlösung hinzu, worauf man einen (nur beim Gehirn des 5. Falles ausgebliebenen) Niederschlag erhält, der durch Filtration von der Flüssigkeit (Flüssigkeit E) getrennt und mit Benzol behandelt wird. Hierin löst er sich gewöhnlich vollständig; das gelöste Benzol wird alsdann zum Sieden gebracht und es werden ihm 5 Volumina absoluten Alkohols zugesetzt. Auf diese Weise fällt daraus, z. T. sofort, z. T. nach dem Abkühlen, das Leukopolyin aus, das, durch Filtration von der Flüssigkeit (Flüssigkeit F) getrennt, mittels weiterer 2 bis 3 Krystallisationen aus dem kochenden absoluten Alkohol gereinigt und dann genauer identifiziert wird, indem man seinen Schmelzpunkt bestimmt. Während der aufeinanderfolgenden

Reinigungen des Leukopolyins bleibt, weil im kochenden Alkohol unlöslich, eine zerreibbare, gelbrötliche, stickstoffhaltige Substanz zurück.

Zweites Acetonextrakt. Nachdem das Aceton bei meistens reduziertem Drucke abdestilliert worden ist, wird der Rückstand (zweiter Acetonrückstand) bis zu konstantem Gewicht im Brutschrank bei 60° getrocknet, dann mit kochendem 85 %igem Alkohol aufgenommen und hierauf genau auf die gleiche Weise behandelt, wie sie für das erste Acetonextrakt beschrieben wurde. Hier fehlte das Leukopolyin nie, auch nicht beim Gehirn 5; die Substanz x dagegen fand sich immer — jedesmal wenn sie angetroffen wurde — entweder nur im ersten Acetonextrakt (Gehirne Cavazzoni und Cioni) oder im Gemisch des ersten und des zweiten (Gehirn Soliani).

Petrolätherextrakt.

Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck bis auf ein kleines Volumen abdestilliert, hierauf werden 5 Volumina absoluten Alkohols in der Kälte zugesetzt und das Ganze wird eine Zeitlang, vor Licht geschützt, sich selbst überlassen. Auf diese Weise fällt das Kephalin aus, das nach Klärung der Flüssigkeit (Flüssigkeit G) wiederholt mit absolutem Alkohol gewaschen, endlich aufgefangen und im Exsiccator getrocknet wird.

Eigenschaften und Identifizierung der isolierten Substanzen und Bruchstücke.

Zur Identifizierung der schon bekannten Stoffe dienten uns außer den durch ihre Herstellungsweise zur Evidenz erwiesenen Eigenschaften (die vergleichenden Wert haben, weil wir, abgesehen von einigen unbedeutenden Einzelheiten, die Technik Fränkels mit den Modifikationen Allers' befolgten), die Art der Krystallisierung (namentlich für das Cholesterin, das auch im unreinen Zustande, in welchem es uns zur Verfügung stand, die charakteristischen Täfelchen zeigt) und der Schmelzpunkt (welcher für das Leukopolyin verwendet wurde).

In den verschiedenen Flüssigkeiten suchten wir den Stickstoff, Phosphor und Schwefel qualitativ zu bestimmen. Was den Stickstoff betrifft, so machten wir eine Schmelze mit NaOH in trockenen Reagensgläsern, indem wir zum Nachweis

des gebildeten Ammoniaks rotes Lackmuspapier verwendeten. Um den S und P aufzusuchen, wurde die Substanz in einer Platinschale mit einem Überschuß eines Gemisches von 3 Teilen Kaliumnitrat und 1 Teil Kaliumcarbonat bis zum Verschwinden des Kohlenstoffs eingeäschert. Dann wurde mit destilliertem Wasser (das zum Sieden gebracht war) aufgenommen, und die so erhaltene Lösung wurde in zwei Teile (*a* und *b*) geteilt. In *a* wurde der Schwefel mit Bariumchlorid (nach wiederholtem Abdampfen mit Salzsäure), in *b* der Phosphor mit dem Molybdänreagens aufgesucht.

Die erhaltenen Resultate waren die folgenden (hinsichtlich der Flüssigkeiten A und B wurde schon oben berichtet): Flüssigkeit C. Die wässerigen Acetonextrakte enthalten stets Stickstoff, dagegen keinen Schwefel und Phosphor (ausgenommen natürlich die Gehirne Cioni und Cavazzoni, in denen statt dessen die Substanz x vorhanden ist). Der Acetonextrakt (Soxhlet) enthält keines der drei Elemente im Gehirn Bacigalupo (4), dagegen alle drei im Gehirn Barbero (5). Im Gehirn Soliani (1), in dem die beiden Extrakte — das wässerige Acetonextrakt und das Soxhlet-Acetonextrakt — zusammen verarbeitet wurden, ist anstatt der Flüssigkeit C die Substanz x vorhanden. In den anderen Gehirnen wurde die Flüssigkeit C des Soxhlet-Acetonextraktes nicht untersucht.

Flüssigkeit D. (Ist nur in den Gehirnen vorhanden, die die Substanz x enthalten, d. h. in den Gehirnen Soliani, Cioni und Cavazzoni). Sie enthält Stickstoff und Phosphor. Der Schwefel fehlt (Soliani) oder ist sehr spärlich vorhanden (Cavazzoni und Cioni).

Flüssigkeit E. Die der wässerigen Acetonextrakte enthält Stickstoff und keinen (oder nur sehr wenig, Luppi) Schwefel; dagegen Phosphor (sie wurde nur bei den Gehirnen Bacigalupo, Barbero und Luppi untersucht). Der Soxhlet-Acetonextrakt wurde, außer in den obenerwähnten Gehirnen, auch im Gehirn Cioni untersucht. Er enthielt konstant Stickstoff und Phosphor; der Schwefel fehlt bei Barbero, ist spärlich bei Cioni, deutlich vorhanden bei allen anderen Gehirnen.

Flüssigkeit F. Sie wurde nur in den Soxhlet-Extrakten der Gehirne Soliani, Barbero und Luppi untersucht: sie enthielt konstant Stickstoff und Phosphor, keinen Schwefel.

Flüssigkeit G. Sie wurde nicht untersucht bei den Gehirnen Cioni und Cavazzoni, ferner wurde auf Schwefel nicht im Gehirn Soliani gefahndet; in allen anderen Gehirnen wurde sie vollständig untersucht. Ohne Phosphor war sie nur im Gehirn Soliani, und ohne Schwefel nur bei Luppi. Konstant war bei allen die Anwesenheit von Stickstoff.

Wie wir schon angedeutet haben, hatten wir Gelegenheit, bei einigen unserer Fälle von progressiver Paralyse — und namentlich bei den Gehirnen Soliani, Cioni und Cavazzoni — die Anwesenheit einer Substanz in den Acetonextrakten (oder besser gesagt im ersten Acetonextrakt) zu konstatieren, die, soviel wir wissen, noch von keinem anderen Autor im Gehirn vom normalen oder von Krankheiten befallenen Menschen angetroffen worden ist. Dieser Substanz, oder besser gesagt ihrer von uns isolierten Cadmiumverbindung geben wir nun einstweilen den Namen Substanz x, bis wir sie mittels weiterer Untersuchungen besser identifizieren können.

Die Substanz x ist ein weiß-gelbliches Pulver, unlöslich, sowohl in der Kälte als in der Wärme, in Wasser, Alkohol, Äther, Aceton, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Pyridin; löslich ist sie dagegen in HCl, auch wenn letztere verdünnt und kalt ist. Zwischen 220° und 227° wird sie dunkel, schmilzt aber nicht einmal bei 280°; mit KNO_3 und K_2CO_3 erhitzt, verkohlt sie. Sie enthält Schwefel, der aber nicht einmal teilweise schwach gebunden ist (es zeigt sich kein Schwarzwerden infolge Kochens mit wässeriger Bleiacetatlösung und Natronlauge im Überschuß); sie enthält ferner Stickstoff und Phosphor und einen sehr hohen Prozentgehalt von Cadmium; Eisen enthält sie nicht. Sie ergibt nicht die folgenden Reaktionen der Kohlenhydrate: Orcinreaktion, Molischsche Re-Reaktion, Schiffsche Reaktion und auch keine mit dem Millonschen Reagens.

Quantitative Beziehungen der Gruppen von aus den verschiedenen Lösungsmitteln extrahierten Stoffen.

Sie sind in der Tabelle angeführt. Das Gewicht des gesamten Acetonextraktes ist gegeben durch die Summe der Gewichte des ersten und des zweiten Acetonrückstandes (mit

Tabelle.

Fälle	Gewicht der bearbeiteten Hirnmasse	Wasser		Gesamt-Trockensubstanz[1])		Gesamt-Acetonextrakt[2])						Petroläther-Extrakt	
						Rohcholesterin		andere Stoffe		Gesamtextrakt			
		absol. Gewicht	bearb. Masse	absolutes Gewicht	bearbeit. Masse	absolutes Gewicht	Trocken-substanz	absol. Gewicht	Trocken-substanz	absol. Gewicht	Trocken-substanz	absol. Gewicht	Trocken-substanz
	g	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
1. Soliani, Napoleone progressive Paralyse	850	(705,6)	**(83)**	(144,40)	**(17)**	(35)	**(24,2)**	(6,56)	**(4,5)**	(41,56)	**(28,7)**	20,63	**(14,28)**
2. Cioni, Luigi . . . . progressive Paralyse	814	635,5	**77,81**	180,47	**22,19**	—	—	—	—	50,02	**30,48**	22,25	**12,33**
3. Cavazzoni, Maria . progressive Paralyse	870	735,78	**84,58**	134,22	**15,42**	18,70	**13,90**	12	**8,97**	30,70	**22,87**	31,07	**23,14**
4. Bacigalupo, Edoardo progressive Paralyse	1110	876,58	**78,97**	233,42	**21,03**	43,51	**18,60**	14,04	**6,00**	57,55	**24,60**	32,52	**13,93**
5. Barbero, Michele . progressive Paralyse	—	—	—	235,62	—	45,90	**19,48**	27,90	**11,84**	73,80	**31,32**	26,48	**11,23**
6. Marri, Augusto . . D. praecox paranoica	907	714	**78,75**	192,80	**21,25**	27,43	**14,23**	8,37	**4,32**	35,80	**18,55**	27,50	**14,25**
7. Luppi, Geminiano . Carcinom des Pylorus	740	573,96	**77,56**	106,04	**22,44**	23,26	**14,00**	6,67	**4,62**	30,93	**18,62**	37,25	**22,44**

[1]) Mit Einschluß des in reinem Aceton unlöslichen Teiles der wässerigen Acetonextrakte (albuminoide Substanz), deren Gewicht 3,5 g bei Gehirn 1, 3,25 g bei 2, 12 g bei 3, 2,05 g bei 4, 6,05 g bei 5, 2,95 g bei 6, 9,70 g bei 7 beträgt.

[2]) Mit Ausschluß der albuminoiden Substanz.

Ausschluß der albuminoiden Substanz, deren Gewicht dagegen zu dem der gesamten Trockensubstanz hinzugerechnet wird). Das Gewicht der gesamten Trockensubstanz ist gegeben durch die Summe des Gewichtes der Hirnmasse, nachdem sie der gründlichen Extrahierung mit Aceton unterzogen wurde, + Gewicht des gesamten Acetonextraktes (mit Einschluß der albuminoiden Substanz). Das Gewicht des Wassers erhält man durch die Differenz zwischen dem Gewicht des ursprünglichen Hirnbreis und dem der gesamten Trockensubstanz. Das Gewicht des Petrolätherextraktes endlich resultiert aus der Differenz zwischen dem der Hirnmasse vor und nach der Extrahierung mit diesem Lösungsmittel.

Wir müssen ferner darauf aufmerksam machen, daß die sich auf das Acetonextrakt (und seine Fraktionen) des Gehirns Soliani beziehenden Daten nur approximativ sind, da wir als $^1/_4$ der Gesamtmenge des Acetonextraktes dieses Gehirns die Menge beechnet haben, welche infolge eines Unfalls im Laboratorium verloren ging.

Behufs einer richtigen Schätzung der in der Tabelle zusammengestellten Werte muß man sich die Mittelwerte vergegenwärtigen, die Fränkel und seine Schüler aus wiederholten Untersuchungen, die sie in großem Maße an normalen menschlichen Gehirnen anstellten, gewonnen haben. Fränkel selbst[1]) resümiert in der folgenden Tabelle seine Resultate der fraktionierten Extraktion des menschlichen Gehirns:

23% Trockensubstanz		Trockensubstanz %
Acetonextrakt	Rohcholesterin	10,96
	Phosphatide und unbestimmte Extraktstoffe	9,64
Petrolätherextrakt		27,836
Benzolextrakt		13,53
Alkoholextrakt		6,256
Ätherextrakt		0,916
Rückstand (Proteine usw.)		31,628

Aus diesem Überblick ergibt sich, daß die Trockensubstanz des Gehirns in runder Ziffer aus $^2/_3$ Lipoidstoffen und nur zu $^1/_3$ aus albuminoiden Stoffen besteht, ferner, daß 10% durch

[1]) S. Fränkel, Über ein neues Verfahren der fraktionierten Extraktion der Gehirnlipoide. Diese Zeitschr. 19, 254, 1909.

Cholesterin, ca. 30 % durch ungesättigte Verbindungen repräsentiert werden. Betrachtet man sodann die Lipoide für sich, so sieht man, daß 17 % von ihnen durch das Cholesterin, 48,293 % durch ungesättigte Verbindungen und 34,482 % durch gesättigte Verbindungen repräsentiert werden.

Vergleichen wir mit diesen Daten die aus unserer Tabelle sich ergebenden, so finden wir, daß — bis zu dem Punkte, bis zu welchem unsere Untersuchungen fortgeschritten sind — nur im Falle 7 (Luppi Geminiano) die Werte des Prozentsatzes an Trockensubstanz und Gesamtacetonextrakt ziemlich gut mit den normalen Werten übereinstimmen; auch in diesem Falle jedoch, der ein altes, carcinomatöses, im Zustand des Marasmus gestorbenes Individuum betrifft, finden wir andere Daten, die von der Norm abweichen, wie einen niedrigen Prozentsatz an Petrolätherextrakt (22,44 % Trockensubstanz) und einen hohen Betrag an Cholesterin im Vergleich mit den anderen Extraktstoffen im Acetonrückstand (14 % Cholesterin und 4,67 % Phosphatide usw.). Diese Abweichungen von den normalen Mittelwerten können zum Teil dem Alter des Individuums zugeschrieben werden — es scheint nämlich nach den Untersuchungen von Koch und Mann (loc. cit.), daß das Greisenhirn etwas reicher an Cholesterin ist als das Hirn junger Leute —, zum Teil auch dem marasmatischen Zustand des Individuums. Im Falle 6 des Augusto Marri, der an Dementia praecox paranoica litt und mit 36 Jahren an akuter Pneumonie starb — Hirn untersucht behufs Vergleichs mit unseren 5 Paralytikern —, bemerkten wir auch außer Abweichung vom Normalen: der Prozentsatz der Trockensubstanz ist niedriger (20,75), und sehr niedrig ist der Prozentsatz der Petrolätherextrakte, während der Prozentsatz des Acetonextraktes beinahe normal ist (18,53), aber auch hier ist ein Überschuß an Cholesterin (14,23) gegenüber den anderen Phosphatiden usw. (4,32). Über den Wert dieser Veränderungen können wir einstweilen nichts sagen; es handelt sich um ein an einer schweren degenerativen Krankheit leidendes Gehirn, und sie entsprechen also wahrscheinlich dem Krankheitszustand des Organs.

Wir sahen schon, daß Koch und Mann ausgeprägte Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung des Gehirns der Dementia praecox-Kranken gefunden haben (Abnahme des

Neutralschwefels). Es kann sein, daß die geringe Zunahme des Prozentsatzes an Cholesterin und die ausgeprägte Abnahme der mit dem Petroläther extrahierten ungesättigten Phosphatide zum Bild der chemischen Pathologie dieser Krankheit gehören, was weitere Untersuchungen entscheiden werden.

Wenn wir nun dazu übergehen, die Resultate der Untersuchungen unserer fünf Paralytiker zu betrachten, so finden wir im großen und ganzen eine überraschende Homogenität der Resultate. Alle Gehirne enthalten einen größeren Prozentgehalt an Wasser als in der Norm; während bei letzterer die Trockensubstanz 23% der Gesamtmasse repräsentiert, finden wir in unseren Fällen **17, 22,19, 15,42, 21,03%**. Noch augenfälliger sind die Unterschiede in den Prozentsätzen der Aceton- und Petrolätherextrakte bei der gesamten Trockensubstanz, da die ersteren beträchtlich erhöht, die letzteren sehr vermindert sind. Einem normalen Werte von 20% von Gesamtacetonextrakt gegenüber finden wir bei den fünf Paralytikern **28,7, 30,48, 22,87, 24,60** und **31,32%**, während wir bei den Gesamt-Petrolätherextrakten 27,84% des Normalen gegenüber **14,28, 12,33, 23,14, 13,93** und **11,23** finden. Ausgeprägte Veränderungen finden wir endlich bei der Verteilung der Mengen von Cholesterin und anderen Phosphatiden im Acetonextrakt in den vier Fällen, in denen sie berechnet werden konnten: gegenüber 10,96% Rohcholesterin und 9,64% an anderen Extraktstoffen beim Normalen finden wir **24,2%** Cholesterin und **4,5%** an anderen Stoffen (Leukopolyin usw.), **13,90** und **8,97**, **18,60** und **6,00**, **19,48** und **11,84%**.

Wie sich aus der Tabelle ergibt, stimmen alle diese Werte miteinander überein, indem sie sich jedoch mehr oder weniger akzentuiert (im Sinne der Abweichung vom Normalen) in einigen Fällen als in anderen darstellen; im Falle 5 nämlich entspricht einem Maximalprozentsatz von Acetonextrakt (31,32) — worunter ein sehr hoher Prozentsatz an Cholesterin (19,48) — ein minimaler Prozentsatz an Petrolätherextrakt (11,23); so im Falle 2, in dem wir leider die verschiedenen Prozentsätze der beiden Fraktionen des Acetonextraktes nicht abgeschätzt haben; dagegen entfernten sich im Falle 3 der Maria Cavazzoni, deren Gehirn tatsächlich auch makroskopisch weniger verändert als das der anderen angetroffen wurde, mit spärlichen Überbleibseln

von Meningoencephalitis, bei dem auch klinisch (es handelt sich um eine Frau!) wenig ausgeprägte Symptome der Krankheit aufgetreten waren, die Werte des gesamten Acetonextraktes (22,87), des Prozentsatzes des Cholesterins (13,90) und des Petrolätherextraktes übereinstimmend weniger von den normalen Werten. Aus diesen individuellen Unterschieden im einzigen Typus der angetroffenen Veränderungen könnte man folgern, daß einige Gehirne mehr, andere weniger reagiert haben, je nach Intensität und Dauer der Krankheit oder je nach der individuellen Widerstandsfähigkeit oder einer wahrscheinlich einheitlichen (toxischen? infektiösen?) Krankheitsursache. Die hervorragendsten Wirkungen dieses Krankheitserregers — luetische Infektion, luetische Toxine, Autotoxine infolge luetischer Läsionen — im Gehirn unserer Paralytiker zeigen sich also in einer beträchtlichen Zunahme des Cholesterins und in einer sehr ausgeprägten Abnahme der ungesättigten Phosphatide, die mit dem Petroläther extrahiert werden können (Kephalin), in der Hirnsubstanz. Drei von unseren Fällen gestatteten uns ferner, im wässerigen Acetonextrakt die Anwesenheit eines Stoffes zu identifizieren, der sich in den vier anderen untersuchten Gehirnen nicht vorfand und bis jetzt bei normalen Gehirnen nicht beschrieben worden ist. Dieser Stoff, den wir einstweilen Substanz x nennen, indem wir uns vorbehalten, seine Eigenschaften in Zukunft genauer zu studieren, der Stickstoff, Phosphor und Schwefel enthält und aus seiner wässerigen Lösung mit Cadmiumchlorid ausfällt, repräsentiert vielleicht ein regressives Produkt irgendeines Schwefelphosphatids, das im normalen Gehirn in den folgenden Extraktionen übergangen worden wäre; einstweilen beschränken wir uns darauf, die Besonderheit des sich nur auf die drei Fälle von progressiver Paralyse beziehenden Befundes zu konstatieren. Was den Umstand anbelangt, daß wir die Substanz x in den beiden anderen Gehirnen von Paralytikern nicht angetroffen haben, so könnte man einstweilen annehmen, daß sie sich nur in bestimmten Stadien der Krankheit vorfindet und in anderen nicht, oder, mit anderen Worten, daß sie ein Produkt von regressiver Umwandlung darstellt, das seinerseits weiteren Umwandlungen unterworfen ist. Gewiß werden ausführliche Untersuchungen, die wir noch anstellen werden in diesem Sinne über die fragliche

Substanz und über alle in den verschiedenen Filtrationsflüssigkeiten enthaltenen anderen Stoffen, die bei unseren Extrakten nur flüchtig untersucht wurden, von Nutzen sein.

Bis jetzt fehlen uns die Daten bezüglich der Prozentsätze der aufeinanderfolgenden Extrakte mittels Benzol, Alkohol und Äther, die wir jetzt machen und binnen kurzem vervollständigen werden; deshalb können wir hier die Prozentsätze des Cholesterins und des Kephalins bei der Gesamtmasse der extrahierten Lipoide nicht berechnen. Die bisher für das Cholesterin und das Kephalin berechneten Werte machen es jedoch wahrscheinlich, daß sie auch gegenüber den Gesamtlipoiden aller Wahrscheinlichkeit nach eine Zunahme resp. Abnahme gegenüber den normalen Werten zeigen werden, wie bei den Prozentzahlen der Gesamttrockensubstanz.

Auf jeden Fall müssen wir hier auf die große Zunahme des Cholesterins in allen von uns bis jetzt untersuchten Paralytikergehirnen hinweisen, eine Zunahme, die im Durchschnitt fast doppelt so große Werte wie beim Normalen erreicht. Um diese aus der chemischen Analyse gefolgerte Erscheinung zu erklären, genügen einige wenige, dem histologischen und mikrochemischen Gebiete entnommenen Beebachtungen. In bezug auf die Anwesenheit von anisotropen Stoffen im Paralytikergehirn, die unter dem Polarisationsmikroskop konstatiert werden, fehlt es an genauen Beobachtungen. Munck weist flüchtig darauf hin, daß er in der Rindensubstanz von Paralytikern und im Rückenmark von Tabikern[1]) — was einer von uns (Pighini) in der Tat in zwei Fällen von untersuchten Paralytikern bestätigen konnte — Blöcke von doppeltbrechenden Stoffen in der Dichte der Rindensubstanz und im Lumen der Gefäße angetroffen hat. Diesbezügliche Untersuchungen, die auf die verschiedenen, durch die histochemische Prüfung nachweisbaren Abbauprodukte ausgedehnt wurden, werden jetzt in unserem Laboratorium von Dr. Barbieri vorgenommen; auf jeden Fall wird die Bestätigung der Anwesenheit von Zersetzungsprodukten der Nervensubstanz, die mit Anisotropie ausgestattet sind, wohl mit unserem chemischen Befund übereinstimmen, da sich aus

[1]) Munck, Über „Lipoide-Degeneration". Virchows Archiv 194, 127. 1908.

den Studien Kawamuras[1]) ergibt, daß nach Zersetzung der Nervensubstanz in den apoplektischen Herden zahlreiche Blöcke von doppeltbrechenden Stoffen angetroffen werden, die aus Gemischen von Cholesterin mit anderen Lipoidstoffen bestehen. (Kawamura hat nachgewiesen, daß, während z. B. das Cholesterin und das Kephalin für sich nicht, dagegen in ihren Gemischen anisotrop werden.) Bei unseren Paralytikern jedoch muß auf Grund unserer Prozentsätze nicht nur eine Anhäufung vo Blöcken von Cholesterin enthaltenden Zersetzungsprodukten a:ı genommen werden, sondern eine wahre Cholesterinverfettung des Gehirns, die im einen oder anderen Falle mehr oder minder stark ausgeprägt ist; dies erscheint uns einstweilen als die plausibelste Erklärung der fast doppelten Zunahme — im Durchschnitt — des Cholesterins in den untersuchten Gehirnen. Durch die neueren Untersuchungen über die Cholesterindegeneration scheint erwiesen zu sein, daß sie fast ausschließlich im Zellkörper ihren Sitz hat; so wurden doppeltbrechende Stoffe mit Cholesterin in den Drüsenzellen, in den Endothel- und Bindegewebszellen, den Plasmazellen und in den Körnchenzellen gefunden. Wie bekannt, ist die Cholesterinverfettung der gewöhnlichste Exponent vieler chronischen Entzündungen, wie der chronischen Nephritis, der Desquamatiopneumonie, der Aktinomykose und der Staphylomykose, sowie der Gonorrhöe; sie begleitet viele Degenerationsprozesse, wie die amyloide Degeneration der Niere, die Arteriosklerose, das Gerontoxon und die pathologischen Neubildungen (Tumoren). Das Paralytikerhirn, das so von den Glia- und Plasmazellen ergriffen wird, d. h. von Zellelementen, die sich bei einigen anderen Krankheiten mit anisotroper Substanz gefüllt zeigen. bietet auch histopathologisch die günstigsten Bedingungen für die Annahme einer Cholesterinverfettung dar. Diesbezügliche Untersuchungen werden vielleicht unsere Hypothese in eine tatsächliche Konstatierung verwandeln.

Es ist noch auf eine andere Tatsache hinzuweisen: die Beziehungen, die eine Cholesterindegeneration des Gehirns haben kann, wie sie sich bei unseren Paralytikern zu ergeben scheint, und die Wassermannsche Reaktion, die sich bei dieser Krank-

[1]) Ringa Kawamura, Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911.

heit im Blute und im Liquor cerebrospinalis als positiv zeigt. Einer von uns (Pighini) hat schon die Aufmerksamkeit der Forscher darauf hingelenkt, daß in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Blutserum der Paralytiker eine beträchtlich größere Menge von Cholesterin angetroffen wird als normal in diesen Flüssigkeiten enthalten (in der normalen Cerebrospinalflüssigkeit sind nur minimale Spuren vorhanden), und gestützt auf eigene experimentelle Untersuchungen und auf die anderer Forscher stellte er die Hypothese auf, daß die Anwesenheit von abnormen Mengen Cholesterin in diesen Flüssigkeiten eine wichtige Rolle für den Ausfall der Wassermannschen Reaktion[1]) spiele (Experimente über diese letzte Frage wurden fortgesetzt angestellt und werden bald veröffentlicht werden. Carbone.) Unsere vor kurzem angestellten chemischen Unsersuchungen ergaben uns eine starke Anhäufung von Cholesterin im Hirn der Paralytiker, ein offenbares Anzeichen eines akzentuierten Cholesterinaustausches in diesem Organ; dazu trägt die schon im Blute und im Liquor cerebrospinalis angetroffene Zunahme des Cholesterins bei und ferner das antikomplementäre Vermögen, das die erwähnten Flüssigkeiten bei der Wassermannschen Reaktion zeigen[2]) — vorausgesetzt, daß die oben angeführte Hypothese, dieses zu erklären, richtig ist.

Die durch unsere Untersuchungen zur Evidenz nachgewiesene weitere Tatsache der ausgeprägten Verminderung

---

[1]) G. Pighini, La colesterina nel liquido cefalo-rachidiano dei paralitici, e sua partecipazione alla reazione di Wassermann. Riforma medica 25, 3, 1909. — Cholèsterine et réaction de Wassermann. Centralbl. f. Nervenheilk. u. Psychol. 10, 1909. — Über den Cholesteringehalt der Lumbalflüssigkeit einiger Geisteskrankheiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, Heft 6, 1909. — Über die Mengen Cholesterins und Oxycholesterins des Serums bei verschiedenen Formen von Geisteskrankheiten. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. 4, 629, 1911.

[2]) Was die zwischen Syphilis und progressiver Paralyse bestehenden ätiologischen Beziehungen betrifft, so wollen wir hier daran erinnern, daß die (als Antigen bei der Wassermannschen Reaktion verwendete) Leber des syphilitischen Foetus, wie sich herausstellte, erhebliche Cholesterinmengen enthielt, die als 10 bis 15mal größer als die der Leber eines normalen Foetus von demselben Alter berechnet wurden (Pighini). Es muß nun untersucht werden, ob der Cholesterinverfettung der Leber bei ererbter Syphilis Cholesterinverfettung in anderen Organen oder Geweben bei der erworbenen Syphilis entsprechen.

— im Durchschnitt ungefähr die Hälfte — des Prozentsatzes von Petrolätherextrakt (Fraktion des Kephalins) stimmt überein mit der Entdeckung Barratts, daß der Phosphorgehalt im Gehirn der Paralytiker beträchtlich vermindert ist (zitiert von Kraepelin), und mit dem, was Koch und Mann konstatiert haben, nämlich, daß der Lipoidphosphor abnimmt, was sie, wie wir gesehen haben, einer Zerstörung im Gewebe von Produkten der Lecithingruppe zuschreiben (l. c.). Diese letztere Entdeckung stimmt mit der unseren überein, da Koch unter der Bezeichnung Lecithine alle Phosphatide zusammenfaßt, die er in seiner den Lipoidphosphor einschließenden ersten Gruppe extrahierte, und da man andererseits aus den Untersuchungen Fränkels (der tatsächlich das Lecithin unter den zahlreichen Phosphatiden des Gehirns nicht gefunden hat) weiß, daß der Hauptrepräsentant der phosphorhaltigen Lipoide in der Hirnsubstanz das Kephalin ist. In Anbetracht der großen Abnahme dieses ungesättigten Phosphatids in den 5 Gehirnen von progressiver Paralyse, die wir angetroffen haben, scheint uns dieser Umstand nicht ohne Wert für die chemische Pathologie dieser Krankheit zu sein, da Fränkel mit Recht diesem Stoff eine hohe physiologische Bedeutung zuerkennt wegen seiner enormen Gier nach Sauerstoff, wegen des hohen Calorienwertes, den er entwickeln kann, und wegen der wichtigen Rolle, die er wahrscheinlich bei der inneren Atmung des Nervengewebes spielt. Demzufolge muß eine starke Abnahme dieses Stoffes notwendigerweise die Funktion des Organs schwer beeinträchtigen.

Endlich muß auf eine Tendenz zur Erhöhung des Prozentgehalts an Wasser gegenüber den festen Stoffen der Hirnmasse hingewiesen werden, eine Tatsache, die auch Barratt schon hervorgehoben hat.

Über die Beziehungen zwischen Tumorzellen und Blutserum.

Von

Ernst Freund und **Gisa Kaminer.**

(Aus dem chemisch-pathologischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung".)

(Eingegangen am 29. Oktober 1912.)

In einer im 26. Bande dieser Zeitschrift erschienenen Mitteilung haben wir über Beziehungen zwischen Tumorzellen und Serum berichtet, deren wesentliche Ergebnisse sich in folgendem zusammenfassen lassen.

Das Serum Carcinomatöser unterscheidet sich vom Serum Nichtcarcinomatöser dadurch, daß es nicht imstande ist, zugesetzte Carcinomzellen zu zerstören, sondern dieselben auch bei 24 stündigem Verweilen bei 37° fast unverändert läßt.

Dieses entgegengesetzte Verhalten beruht auf der Anwesenheit, resp. dem Mangel spezifischer Substanzen im Serum. Das Normalserum enthält eine mit Äther extrahierbare, mit Lecithin nicht identische, bei 55° zerstörbare, nicht dialysable Substanz, die mit der Albuminfraktion aussalzbar und mit den Eiweißkörpern mit Alkohol fällbar ist und isoliert dieselbe zellzerstörende Wirkung ausübt wie das normale Serum.

Diese Substanz ist im carcinomatösen Serum nicht nachweisbar; andererseits besitzt das carcinomatöse Serum eine mit der Euglobulinfraktion ausfällbare, speziell dem in Na_2CO_3 löslichen Anteil angehörende Substanz, die zugesetzte Carcinomzellen vor der Zerstörung schützen kann.

Die Fortsetzung unserer Studien hat sich nun nach mehreren Richtungen erstreckt. Vor allem interessierte uns die diagnostische Verwendbarkeit, über die wir an anderer Stelle[1]) berichtet haben.

[1]) Wiener klin. Wochenschr. **1911**, Nr. 51.

Zweitens mußte es unsere Aufgabe sein, klarzustellen, in welchem Verhältnis diese Substanzen zum Wesen des Carcinoms stehen, insbesondere ob diese Substanzen als Folgeerscheinung der Carcinome aufzufassen seien oder im Sinne unserer Voraussetzungen als ein disponierendes Moment.

Für die Beantwortung der Frage, ob die gefundenen Substanzen als Folgeerscheinung von Carcinom aufzufassen seien, wäre die Untersuchung des Blutserums post operationem wohl der kürzeste Weg gewesen; leider standen uns nur wenige Fälle post operationem zur Untersuchung zur Verfügung. Mit Rücksicht auf die Schwierigkeit der Beschaffung solchen Materiales haben wir, ohne diese Frage zunächst zu entscheiden, versucht, die wirksamen Substanzen reiner darzustellen, um ihre Wirkungsweise auf die Zellen zu studieren.

Ätherlösliche, zellzerstörende Substanz des Normalserums.

Wie wir schon in der ersten Publikation mitgeteilt haben, gelingt es, durch Ausschütteln des normalen Serums mit Äther die wirksame Substanz in ätherische Lösung zu bringen.

Zur weiteren Isolierung wurde die ätherische Lösung mit einer 1%igen Lösung von kohlensaurem Natron geschüttelt, wobei die aktive Substanz in die Natronlösung überging und aus dieser, nach Ansäuerung mit Phosphorsäure, wieder mit Äther extrahierbar war.

Der Rückstand des mit Wasser mehrmals gewaschenen Äthers war eine leicht gelb gefärbte, stark sauer reagierende Säure, die den Schmelzpunkt 39° zeigte, frei von Stickstoff und Schwefel war und ein in Wasser und in Alkohol unlösliches Barytsalz und Silbersalz gab.

Ätherunlösliche, zellschützende Substanz.

Wie wir schon in der ersten Publikation mitgeteilt haben, hängt die Schutzwirkung des Carcinomserums für die Carcinomzellen an der Euglobulinfraktion. Bei der weiteren Isolierung sind wir nun folgendermaßen vorgegangen. Die Fraktion zeigte nach der Dialyse sowohl gelöste als ungelöste Bestandteile. Die Mischung wurde filtriert und der auf dem Filter gebliebene Rückstand zunächst mit 0,6%iger Kochsalzlösung und dann mit 0,1%iger Lösung von kohlensaurem Natron in Lösung gebracht.

Die Lösungen wurden auf einen Gehalt von 0,6% NaCl gebracht und dann alle drei Lösungen auf ihre Schutzwirkung gegenüber Carcinomzellen geprüft, indem gleichzeitig Kontrollversuche mit den entsprechenden Salzlösungen angestellt wurden. Das Ergebnis dieses Versuches war, daß nur die in kohlensaurem Natron in Lösung gegangenen Bestandteile Schutzwirkung für Carcinomzellen aufwiesen. Es handelt sich also um jene Substanz, die sich durch Phosphorsäurereichtum auszeichnet und den Namen Nucleoglobulin führt. Naturgemäß haben wir daraufhin auch von Normalseris die Globulinfraktionen diesbezüglich untersucht, konnten aber keine zellschützende Wirkung in ihnen nachweisen.

Es war somit festgestellt, daß die Schutzwirkung gegenüber Carcinomzellen an eine Fraktion des Euglobulins gebunden ist, die allerdings auch in normalem Serum vorkommt, ohne aber Schutzwirkung gegenüber Zellen zu zeigen. Es war daher unser begreifliches Interesse, zunächst einmal in einigen Reaktionen Unterschiede der Euglobulinfraktionen verschiedener Sera aufzusuchen. Für diese Untersuchungen kam uns zur Hilfe, daß wir auch aus Punktionsflüssigkeiten die verschiedenen Fraktionen darstellen konnten, die ebenfalls entgegengesetztes Verhalten, je nachdem sie von carcinomatösen oder nichtcarcinomatösen Individuen stammten, gegenüber Carcinomzellen zeigten und wir so über genügende Mengen von Euglobulinen verfügten.

Als einfachstes Aufklärungsmittel diesbezüglich erschien uns die Anstellung der verschiedenen Farbenreaktionen der Eiweißkörper, die ja auch Reaktionen verschiedener Atomgruppen sind und die Schätzung der relativen Stärke gegeneinander.

Die durch Dialyse erhaltenen unlöslichen Euglobuline wurden zunächst mit NaCl-Lösung gewaschen, solange das Filtrat noch Eiweißreaktion zeigte, und der am Filter verbleibende Rückstand mit 0,1% Na_2CO_3 in Lösung gebracht. Von der erhaltenen Lösung wurde zunächst der Stickstoffgehalt ermittelt, dann die Lösungen auf Volumen von gleichem Stickstoffgehalt gebracht; von dieser Lösung wurde Trockengehalt, Xanthoproteinsäure-, Biuret-, Millon-, Molisch- und Adamkiewicz-Reaktion untersucht.

Vergleichstabelle
der Nucleo-Euglobuline aus normalem und Carcinom-Euglobulin.

Reaktion	Normal-Euglobulin 0,2 g N (%)	Carcinom-Euglobulin 0,2 g N (%)
Xanthoprotein	orangegelb	orangegelb
Millon	lichtrot	dunkelrot
Adamkiewicz	schwach rosa	rot
Liebermann	schwach violett	stark violett
Biuret	violett	violett
Molisch	gelb	rot

Als besonders auffallender Unterschied zeigt sich somit ein Gehalt des Carcinom-Euglobulins an Kohlenhydrat.

Es war naheliegend, nach diesen Feststellungen die gegenseitigen Beziehungen der zelllösenden und zellschützenden Substanzen zu studieren.

Zur Feststellung der Beziehungen der zellzerstörenden und -schützenden Substanz haben wir einen Versuch unternommen, bei dem ätherlösliche Substanz mit dem zellschützenden Euglobulin vermischt wurde und diese Mischung auf zellzerstörende Wirkung geprüft wurde.

Die ätherlösliche Substanz aus 100 ccm Pferdeserum wurde in 10 ccm 0,1 %iger Lösung von kohlensaurem Natron möglichst fein emulgiert, 12 Tropfen davon mit 8 Tropfen eines Carcinomserums gemengt und damit der übliche Zellversuch aufgestellt.

Dabei hat sich gezeigt, daß das Zellzerstörungsvermögen erloschen war, während gleichzeitig angestellte Kontrollversuche die Wirksamkeit der einzelnen Faktoren ergaben.

Ein Versuch in gleicher Weise mit in Na_2CO_3 löslichem Euglobulin ergab, daß auch das Euglobulin in demselben Verhältnis imstande ist, die zellzerstörende Kraft der ätherlöslichen Substanz aufzuheben.

Es besteht demnach im carcinomatösen Serum ein Zerstörungsvermögen für freie, ätherlösliche Substanz des normalen Serums und ihrer Wirksamkeit, die an das Nucleoglobulin der Euglobulinfraktion gebunden ist.

Eine Vervollständigung dieses Befundes zeigte sich in der Tatsache, daß aus normalem Serum gewonnene ätherlösliche Substanz, auch mehrmals hintereinander carcinomatösem Serum zugesetzt, größtenteils verschwand.

Das carcinomatöse Serum besitzt also die Eigenschaft, die ätherlösliche Substanz funktionell ihrer Wirksamkeit zu berauben.

Diese Erkenntnis hat unseren Untersuchungen eine neue Richtung gegeben. Wenn unsere ersten Untersuchungen in der zellzerstörenden Wirksamkeit der ätherlöslichen Substanz des normalen Serums die wichtigsten Eigenschaften ahnen ließen, so zeigten die eben angeführten Untersuchungen, daß eine nicht geringe Menge dieser wichtigen Substanz von dem Nucleoglobulin des carcinomatösen Serums zerstört werden könne. Dadurch war gerade diese Substanz in den Vordergrund des Interesses gerückt.

Und so haben sich hauptsächlich die nachfolgenden Versuche mit dieser Substanz beschäftigt.

Und dies um so mehr, als weitere Versuche auch nachwiesen, daß es genügt, die übliche Menge Carcinomzellen mit 8 Tropfen Carcinomserum 1 Stunde bei 40° zu belassen und dann das Carcinomserum nach Zentrifugierung der Zellen zu entfernen, um diese Carcinomzellen gegen die Zerstörung durch neu hinzugesetzte 12 Tropfen Normalserum zu schützen.

Man darf also schließen, daß aus dem Carcinomserum eine Substanz an die Carcinomzellen tritt, die dieselben gegen die Zerstörung durch normales Serum schützt.

Von der einfachen Auffassung ausgehend, daß die Schutzwirkung chemisch wohl als ein dem Lösungsprozeß entgegengesetzter aufzufassen sei, lag es nahe, anzunehmen, daß hierbei im Gegensatz zur Lösung der Randpartien eine unlösliche Verbindung mit der Zellwand entstehe.

Zur Feststellung dieser Annahme haben wir nun Versuche angestellt, ob Extrakte von Tumoren mit Carcinomserum unlösliche Niederschläge geben. Tatsächlich hat sich gezeigt, daß eine Reihe von Preßsäften von Carcinomen mit 0,6 % NaCl bei so starker Verdünnung, daß die Flüssigkeiten nur leichte Opalescenz zeigten, bei ihrer Zufügung zu Carcinomserum Trübung ergab, während bei Zufügung zu Normalserum keine Trübung zu erkennen war.

Zur Klarstellung der bei dieser Reaktion in Aktion tretenden Faktoren haben wir die einzelnen wirksamen Substanzen zu isolieren versucht.

Darstellung der für die Trübungsreaktion wirksamen Substanzen des Carcinomserums.

Nachdem festgestellt war, daß die wirksame Substanz nicht dialysabel sei und in der Albuminfraktion nicht auffindbar, haben wir die zwei Fraktionen der Globuline untersucht und gefunden, daß nur die Euglobulinfraktion die trübende Eigenschaft besaß.

Bei der weiteren Isolierung sind wir so vorgegangen, daß die bei der Dialyse restierende Euglobulinfraktion zunächst filtriert wurde; da im Filtrat die trübende Wirkung nicht zu konstatieren war, haben wir aus der unlöslichen Substanz Extrakte gemacht.

Die unlösliche Substanz wurde mit 0,6 %iger NaCl-Lösung ausgezogen. Auch dieser Extrakt zeigt, wenn er klar filtrierte, bei Vermischung mit Carcinomextrakten die spezifische Trübung nur in äußersten Spuren. In Fällen, wo klares Filtrat nicht zu erzielen war, war es nötig, vorher Kohlensäure einzuleiten. Erst ein Auszug des am Filter verbliebenen unlöslichen Anteiles der Euglobulinfraktion mit 0,1 % Na_2CO_3 zeigte sehr deutliche Präcipitation mit Carcinomextrakt.

Die präcipitierende Wirkung ist also ebenfalls an jenen Körper gebunden, der den Namen Nucleoglobulin führt. Daß es sich hierbei nicht um das normale Euglobulin handeln kann, geht daraus hervor, daß Euglobulin auf dieselbe Weise aus normalem Serum dargestellt keine Trübung im Carcinomextrakt ergab.

Darstellung der wirksamen Substanz im Carcinomextrakt.

Die Versuche zur reinen Darstellung des Carcinomextraktes wurden dadurch begünstigt, daß die Wirksamkeit in den Filtraten auch nach Aufkochen mit Essigsäure zu erhalten war.

Zwecks weiterer Isolierung haben wir den Extrakt mit dem mehrfachem Volumen Alkohol gefällt, diese Fällung mehrmals wiederholt. Es hat sich gezeigt, daß die sehr geringe Fällung, die dabei entstand, die wirksame Substanz größtenteils enthielt.

Die chemische Untersuchung des Niederschlages ergab, daß Biuret- und Adamkiewicz-Reaktion negativ war, nur Xanthoproteinreaktion in Spuren vorhanden war, während die Molisch-Reaktion stark positiv, Phosphorsäurereaktion in Spuren, Nuclein-

körperreaktion negativ war. Es ließ sich daraus der Schluß ziehen, daß die wirksame Substanz nicht den Eiweißkörpern angehört, sondern mit einem Körper der Kohlenhydratgruppe in Zusammenhang steht. Andererseits zeigte eine Behandlung mit Äther, daß die wirksame Substanz dadurch zerstört war, denn sie war weder im Ätherextrakt noch im ätherextrahierten Teil nachweisbar.

Chemische Untersuchung des spezifischen Niederschlages.

Für die chemische Untersuchung war es uns von großem Vorteil gewesen, daß bei Sarkomen sich ähnliche Verhältnisse fanden, d. h. daß Sarkomserum mit Sarkomextrakt (analog dem Carcinomextrakt dargestellt) spezifische Trübungen ergaben. Die wirksame Substanz des Sarkomserums ist an die Pseudoglobulinfraktion gebunden.

Durch die Gegenüberstellung des spezifischen Carcinom- und Sarkomniederschlages bot sich die Möglichkeit, charakteristische chemische Eigenschaften zu erkennen.

Wir haben diese Unterschiede in kleinen Mengen an Serumniederschlägen und späterhin in größeren Mengen an Niederschlägen aus serösen Flüssigkeiten konstatieren können.

Wir haben zu diesem Zwecke aus zwei Flüssigkeiten, die nach den groben physikalischen und chemischen Verhältnissen ziemlich gleichartig waren, die spezifischen Niederschläge dadurch hergestellt, daß wir zu je 100 ccm Punktionsflüssigkeit die entsprechenden Mengen Extraktsubstanz so lange hinzufügten, als eine Zunahme des Niederschlages zu bemerken war. Die entstandenen Niederschläge wurden absetzen gelassen, durch Zentrifugieren und Waschen mit 0,6 $^0/_0$ NaCl gereinigt und schließlich in $^1/_{10}$-Normallauge gelöst und auf ein bestimmtes Volumen gebracht und nach Feststellung des Stickstoffgehaltes (Kjeldahl) durch Verdünnung der N-reicheren Lösung auf gleichen Stickstoffgehalt gebracht.

Von diesen Lösungen wurde in wenigen Tropfen Xanthoprotein-, Biuret-, Pepsinverdauungs-, Molisch-, Schwefel-, Phosphor- und Zuckerreaktion untersucht, deren Resultate in nebenstehender Tabelle verzeichnet sind.

Es haben sich bei diesem ersten Versuche spezifische Unterschiede in der Kohlenhydrat- und Biuretgruppe ergeben

Untersuchung des Sarkom- und Carcinomniederschlages.

Reaktion	Sarkom	Carcinom
N-Gehalt	0,05 g N (%)	0,05 g N (%)
Xanthoprotein	stark positiv	schwach positiv
Biuret	stark positiv	schwach positiv
Schwefel	negativ	positiv
Phosphor	negativ	positiv
Salzsäurepepsin	Opalescenz wie vorher	Niederschlag
Molisch	negativ	stark positiv
Zucker	negativ	positiv

derart, daß die Carcinomniederschläge an biuretgebenden Substanzen arm und an Kohlenhydraten reich waren, während die Sarkomniederschläge im Gegensatz zu den Carcinomniederschlägen arm an Kohlenhydraten und reich an biuretgebenden Substanzen waren.

Es lag nahe, anzunehmen, daß diese Unterschiede darauf zu beziehen seien, daß die verwendeten Tumorenextrakte und serösen Flüssigkeiten einen verschiedenen Gehalt an Molisch- und Biuretreaktion gebenden Substanzen hätten. Nun zeigte allerdings die Punktionsflüssigkeit des verwendeten Carcinoms eine deutlichere Molisch-Reaktion als die sarkomatöse und der Carcinomextrakt zeigte im Gegensatz zum Sarkomextrakt auch eine deutliche Molisch-Reaktion. Immerhin blieb auffallend, daß der Sarkomniederschlag keine Molisch-Reaktion zeigte. Um nun zu entscheiden, ob es sich bei diesen gefundenen Reaktions-Differenzen um spezifische Substanzanziehungen handle, haben wir den vorstehenden Versuch nur mit der Änderung wiederholt, daß wir 0,1% Pepton und 0,1% Zucker den Punktionsflüssigkeiten zufügten.

Die Resultate sind in umstehender Tabelle verzeichnet.

Obwohl nun bei diesem Versuch — mit Rücksicht auf die zugesetzten großen Mengen Zucker und Peptonlösung — der Gehalt an Zucker und Pepton als gleich angesehen werden konnte, zeigten Kohlenhydrat und Biuretreaktion des entstandenen Niederschlages einen markanten Unterschied, der mit Rücksicht auf die Stärke der Reaktionen darauf bezogen werden mußte, daß von den zugefügten Zucker-Peptonlösungen nennenswerte Anteile in die Niederschläge eingegangen waren, was einem

Untersuchung des Carcinom- und Sarkomniederschlages nach Zufügung von Pepton und Zucker.

Reaktion	Carcinom	Sarkom
N-Gehalt	0,05% (g N)	0,05% (g N)
Xanthoprotein	schwach positiv	stark positiv
Biuret	Spuren	stark positiv
Liebermann	farblos	schwach violett
Adamkiewicz	fast farblos	deutlich rosa
Molisch	stark positiv	Spuren
Zucker (Fehling)	deutlich reduzierend	negativ
Schwefel (Bleizucker mit Kalilauge)	citronengelb	farblos
Salzsäure-Pepsin	deutliche Trübung	klar

spezifischen Selektionsvermögen der Tumoren entsprechen würde. Für dieses Bindungsvermögen sprach noch die Tatsache, daß sowohl Zucker wie Pepton, die doch wasserlöslich sind, in eine wasserunlösliche Verbindung übergeführt waren. So interessant diese Resultate waren, so mußten wir uns doch vorhalten, daß wir mit zwei Punktionsflüssigkeiten gearbeitet hatten, die, so ähnlich sie auch waren, doch viele chemische uns unbekannte Unterschiede aufweisen konnten. Es war uns wünschenswert, die Niederschläge an einem Substrat zu erzeugen, das sich nur durch die spezifischen Anteile des Sarkoms und Carcinoms unterscheiden würde. Diese Forderung glaubten wir dadurch erfüllen zu können, daß wir solche spezifische Niederschlagsbildungen derart erzeugten, daß wir zu je 50 ccm eines normalen Serums einerseits Carcinom-Euglobulin, andererseits Sarkom-Pseudoglobulin im gleichen Stickstoffgehalte zufügten und dann mit entsprechenden Extraktflüssigkeiten versetzten. Die nun wieder entstandenen Niederschläge wurden isoliert untersucht und ergaben die in nachstehender Tabelle verzeichneten Resultate.

Reaktion	Sarkom	Carcinom
Xanthoprotein	von gleicher deutlich	orangegelber Farbe
Biuret	stark positiv	Spuren
Liebermann	deutlich	farblos
Adamkievicz	deutlich rosa	fast farblos
Molisch	Spuren	stark positiv
Zucker (Fehling)	negativ	deutlich reduzierend
Schwefel (Bleizucker in KOH)	farblos	citronengelb
Salzsäure-Pepsin	Spuren	deutliche Trübung

Es haben sich also auch in diesem Versuche, bei dem sich die Serummengen nur durch ihren Gehalt an spezifischen Euglobulin und Pseudoglobulin unterschieden, dieselben markanten Unterschiede ergeben, wie in den früheren Versuchen. Es zeigt sich somit, daß die spezifischen Niederschläge in bezug auf Kohlenhydratsubstanzen und Biuretreaktion gebende Substanzen ein entgegengesetztes Verhalten zeigen, derart, daß der spezifische Carcinomniederschlag besonders reich an Kohlenhydraten, der spezifische Sarkomniederschlag besonders reich an biuretgebenden Gruppen ist. Berücksichtigt man, daß im Versuch 2 die Punktionsflüssigkeiten einen gleichen Gehalt an biuretgebenden Substanzen und Zucker enthielten, so ergibt sich, daß in diesen Niederschlägen sich ein spezifisches Selektionsvermögen zeigt.

Nach diesen Versuchen lag es nahe nachzusehen, ob auch die spezifischen Euglobuline resp. Pseudoglobuline ein elektives Verhalten gegenüber Nährstoffen haben.

Die beiden Fraktionen wurden aus Punktionsflüssigkeiten einerseits eines Carcinom-, andererseits eines Sarkomfalles dargestellt. Je 30 ccm der Fraktionen, entsprechend der ursprünglichen Konzentration der Punktionsflüssigkeiten, werden mit je 30 ccm einer 0,1 $^0/_0$ igen Zucker-Peptonlösung versetzt, 2 Stunden bei 40° belassen und durch 6 Tage gegen strömendes Wasser dialysiert.

Unlösliches Euglobulin.

Reaktion	Carcinom	Sarkom
N-Gehalt	0,05 $^0/_0$ (g N)	0,05 $^0/_0$ (g N)
Xanthoprotein	gering	deutlich
Biuret	fast ∅	Spuren
Molisch	deutlich positiv	negativ
Fehling	positiv	negativ

Pseudoglobulin.

Reaktion	Carcinom	Sarkom
N-Gehalt	0,05 $^0/_0$ (g N)	0,05 $^0/_0$ (g N)
Xanthoprotein	Spuren	stark positiv
Biuret	∅	stark positiv
Molisch	Spuren	∅
Zucker	∅	∅

Naturgemäß ergab sich bei der Dialyse ein löslicher und unlöslicher Anteil. Der lösliche sowie unlösliche Anteil wurden untersucht; nur die letzteren geben Differenzen.

Es zeigt sich somit, daß auch die Eiweißfraktionen bei Sarkom und Carcinom, deren Spezifität bisher nur aus ihren Beziehungen zur Niederschlagsbildung zu erkennen war, eine Spezifität derart zeigen, daß sie bestimmten Nährsubstanzen gegenüber ein charakteristisches Selektionsvermögen zeigen.

Dieses Selektionsvermögen scheint uns deshalb bemerkenswert, weil es stattfindet zwischen Carcinomzellen-Extraktsubstanz und Serumbestandteilen und darauf schließen läßt, daß solche Selektionen auch im Organismus vor sich gehen könnten.

Dies war für uns Veranlassung, in einer Reihe von Versuchen nachzusehen, inwiefern sich ein spezifisches Selektionsvermögen für einzelne Nährsubstanzen bei den isolierten Zellen des Carcinoms resp. Sarkoms nachweisen läßt. Der Versuchsplan ging dahin, zu isolierten Zellen Nährlösungen zuzusetzen, nach längerem Einwirken die Zellen auszuschleudern und nachzusehen, ob einerseits eine Abnahme in einer Substanz der überstehenden Flüssigkeit, andererseits eine Zunahme der zugesetzten Substanz in den Zellen stattgefunden habe[1]). Ein solcher Nachweis schien aber von vornherein dadurch erschwert, daß, wie man erwarten mußte, nicht nur die zugesetzten Nährsubstanzen in die Zellen aufgenommen, sondern auch von dem Zellinhalte Anteile (Kohlenhydrate und Eiweißkörper) an die überstehende Flüssigkeit abgegeben werden konnten. Weiter mußte man darüber klar sein, daß eine geringe Aufnahme der Nährstoffe von den Zellen als nichts Auffallendes erscheinen müsse.

Zwei Umstände sind nun unseren Versuchen in günstiger Weise entgegengekommen. Es hat sich vor allem gezeigt, daß unsere isolierten Zellen so weit zu waschen waren, daß in der überstehenden Flüssigkeit weder Kohlenhydrate noch Eiweißkörper deutlich nachzuweisen waren. Zweitens war uns durch gleichzeitige Untersuchung an Sarkom und Carcinom die Möglichkeit gegeben, zu erkennen, ob Unterschiede in der spezifischen Anziehung bestehen. Wir sind bei den nun folgenden Versuchen

---

[1]) Siehe auch Wiener klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 12, S. 776 über einen Vorschlag Landsteiners betreffs des Nachweises von Eiweißanziehung durch Tumorzellen.

so vorgegangen, daß wir zu ca. 2 ccm unserer Zellaufschwemmungen nach Zentrifugieren und Abgießen der überstehenden kohlenhydrat- und biuretfreien Flüssigkeit 1 ccm einer Lösung zusetzten, die 0,6 % NaCl, 0,1 % Witte-Pepton, 0,1 % Traubenzucker, 0,1 % Lecithin und 0,1 % Nuclein enthielt. Nach gutem Durchschütteln verblieben diese Mischungen 1 Stunde im Brutschrank bei 37°, dann wurde zentrifugiert, zweimal mit 0,6 % NaCl gewaschen, dann die erstabgegossenen Flüssigkeiten und die gewaschenen Zellen auf die obigen Substanzen untersucht. Beim Nachweis gingen wir folgendermaßen vor:

Für den Nachweis von Zucker und Biuretkörpern benützten wir 2 bis 3 Tropfen einer Fehlingschen Kupferlösung, die wir zu 10 Tropfen der mit 1 Tropfen $^1/_{10}$-Lauge alkalisch gemachten Versuchsflüssigkeit setzten. Für den Nachweis der Gesamtkohlenhydrate wurde die Molisch-Reaktion gemacht. Für den Nachweis von Lecithin begnügten wir uns mit dem Zusatz von Osmiumsäure, die uns als Reagens genügen konnte, da ja jede andere ungesättigte Fettsäure in diesen Mengen ausgeschlossen war.

Nuclein wurde durch die Trübung bei Salzsäure-Pepsin-Verdauung und nachfolgendem Phosphornachweis in der Trübung nachgewiesen.

Der Untersuchung des Zellmaterials ging eine Lösung der Zellen in $^1/_{10}$-Lauge voraus.

Es hat sich ergeben, daß, obwohl unter möglichst gleichen Umständen gearbeitet wurde, die überstehende Flüssigkeit wie die Zellen wesentliche Unterschiede aufwiesen.

Die mit den Carcinomzellen vermischt gewesene Flüssigkeit zeigte deutliche Abnahme in der Zucker-, Kohlenhydrat-, Lecithin- und Nucleinreaktion, die mit Sarkomzellen vereinigt gewesene Flüssigkeit dagegen eine Abnahme in Pepton- und Nucleinreaktion. Diese Abnahme war aber nicht als Zerstörung der Substanzen, sondern als Folge der Resorption durch die Zellen aufzufassen, weil, wie die Untersuchung der Zellen zeigte, die Substanzgruppen, die in den Flüssigkeiten vermindert waren, in den entsprechenden Zellen vermehrt waren.

Die Versuche haben also ergeben, daß Carcinom- und Sarkomzellen ein unterschiedliches Selektionsvermögen in bezug auf Kohlenhydrate und Biuretkörper zeigen.

Eine solche Tatsache gibt aber eine neue Grundlage dafür ab, daß das Wachstum der Tumorzellen, indem es spezifische Nährstoffe in spezifisch eigenartiger Form bindet, auch von der Zufuhr respektive dem Mangel solcher Substanzen abhängt.

Schlußsätze.

1. Die Eigenschaft des normalen Serums, Carcinomzellen zu zerstören, haftet an einer in Äther löslichen stickstofffreien Fettsäure.

2. Die Eigenschaft des carcinomatösen Serums, die Carcinomzellen vor der Zerstörung durch normales Serum zu schützen, ist ebenso wie die Eigenschaft, mit Kochsalzextrakten des Carcinoms spezifische Trübungen zu geben, an den in kohlensaurem Natron löslichen Anteil des Euglobulins (Nucleoglobulin) gebunden, der sich durch einen Reichtum an einer Kohlenhydratverbindung vom normalen Nucleoglobulin unterscheidet.

3. Die Eigenschaft der Carcinomextrakte mit Carcinomserum spezifische Trübungen zu geben, wird durch eine stickstofffreie Kohlenhydratverbindung hervorgerufen.

4. Die spezifischen Niederschläge von Carcinomextrakt resp. Sarkomextrakt mit den betreffenden Seris unterscheiden sich dadurch, daß die ersteren reich an Kohlenhydrat, die letzteren dagegen reich an biuretgebenden Substanzen sind. Bei der Niederschlagsbildung ziehen die spezifischen Niederschläge zugesetzten Zucker resp. Pepton in spezifischer Weise an, und zwar die Carcinomniederschläge Zucker, die Sarkomniederschläge Pepton.

5. Ein analog differentes Selektionsvermögen zeigen die Tumorzellen. Carcinomzellen binden besonders Zucker, Lecithin, Nuclein. Sarkomzellen binden besonders Pepton und Nuclein.

Über den Mechanismus der alkoholischen Gärung.

Von

A. v. Lebedew.

(Aus dem Agrikultur-chemischen Laboratorium des Donauer Politechnikums.)

(Eingegangen am 19. Oktober 1912.)

Harden und Young[1]) haben eine ausführliche, über 20 Druckseiten fassende Arbeit zur Widerlegung meines im vorigen Jahre gegebenen Schemas des Gärungsprozesses[2]) veröffentlicht, ohne die angekündigte folgende Mitteilung über denselben Gegenstand mit Geduld abzuwarten. Indessen betrachtete ich damals das Schema keineswegs als endgültiges, sonst hätte ich mir die Fortsetzung jener Arbeit nicht vorbehalten.

Das sine qua non der Gültigkeit des Schemas war, daß auch Glycerinaldehyd bei der Gärung in Gegenwart des Phosphats in ähnlicher Weise verestert wird[3]). Das ist aber, gegen meine Erwartung, nicht der Fall. Diesbezüglich habe ich in meiner letzten Arbeit, die ich in Gemeinschaft mit Herrn Griaznoff ausgeführt habe und die bald erscheinen soll, das folgende Schema des Gärungsprozesses vorgeschlagen:

1. $4C_6H_{12}O_6 = \underset{\text{Glycerinald.}}{4C_3H_6O_3} + \underset{\text{Dioxyaceton}}{4C_3H_6O_3}$
2. $\underset{\text{Glycerinald.}}{4C_3H_6O_3} - 4H_2 = 4C_3H_4O_3$
3. $4C_3H_4O_3 = 4C_2H_4O + 4CO_2$
4. $4C_2H_4O + 4H_2 = 4C_2H_6O$

2′. $\underset{\text{Dioxyaceton}}{4C_3H_6O_3} + 4RHPO_4 = 4C_3H_5O_2RPO_4 + 4H_2O$

3′. $4C_3H_5O_2RPO_4 = 2C_6H_{10}O_4(RPO_4)_2$

4′. $2C_6H_{10}O_4(RPO_4)_2 + 4H_2O = 2C_6H_{12}O_6 + 4RHPO_4$

5. $2C_6H_{12}O_6 = \underset{\text{Glycerinald.}}{2C_3H_6O_3} + \underset{\text{Dioxyaceton}}{2C_3H_6O_3}$ usw.

---

1) Diese Zeitschr. **40**, 458, 1912.

2) Compt. rend. **153**, 136, 1911; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 2932, 1911.

3) l. c. S. 2941.

Man sieht nun, daß der Haupteinwand von Harden und Young, daß ich die von ihnen entdeckte „Übereinstimmung in der zugefügten Phosphat- und der darauf gebildeten Gärungsmenge ganz außer acht gelassen habe“ [1]), hinfällig geworden ist, da nach diesem Schema auch die Harden-Youngsche Gleichung [2]) erfüllt wird:

$$2C_6H_{12}O_6 + 2Na_2HPO_4 = 2CO_2 + 2C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2 + 2H_2O,$$

nur findet sie eine ganz andere Erklärung. Ich möchte hier ausdrücklich betonen, daß ich das hier angeführte Schema nur auf Grund meiner Versuche mit Glycerinaldehyd entwickelt habe, ohne Rücksicht auf die oben erwähnten Versuche von Harden und Young, die ich wirklich „außer acht gelassen habe“.

Nun freue ich mich, daß ihre Versuche einen neuen Beweis für die Richtigkeit des Schemas liefern, nur bedauere ich, daß sie einige von meinen „Behauptungen“ vollständig entstellt haben. Sie schreiben z. B.: „v. Lebedew behauptet, daß Dioxyaceton in einer Konzentration bis zu 5% ebenso schnell wie Zucker vergärt, daß jedoch in höheren Konzentrationen die Gärung eine trägere wird. Seine Erklärung hierfür ist, daß in höheren Konzentrationen das Dioxyaceton eine hemmende Wirkung auf die Zymase ausübt“ [3]).

In meiner Abhandlung steht aber: „. . . das Dioxyaceton bis zu 5% Konzentration ebenso gut gärt wie der Rohrzucker, nur etwas langsamer, was auf die schädliche Wirkung des Dioxyacetons auf die Zymase zurückzuführen ist. Bei Zusatz von großen Mengen Phosphat wird die Geschwindigkeit des Prozesses bedeutend verlangsamt. Dasselbe gilt auch für Rohrzucker . . .“ [4]) Es scheint mir, daß es nicht möglich ist, noch deutlicher seine Gedanken auszudrücken, die Autoren aber haben sich viel Mühe gegeben, das zu entkräften, was ich nie habe behaupten können, da mir die eigenen Versuche die langsamere Vergärbarkeit des Dioxyacetons im Vergleich mit Rohrzucker deutlich zeigten. Mein neues Schema erklärt auch diese Erscheinung gut.

Die Autoren bezweifeln [5]), daß das Dioxyaceton in großen Konzentrationen schädlich auf den Saft wirkt, doch wurde diese Tatsache schon von Buchner und Meisenheimer [6]) festgestellt.

Harden und Young wollen es damit erklären, daß „bei hohem Gehalte das Enzym schon vor der gänzlichen Vergärung des Zuckers abstirbt“ [7]). Das ist aber eine Wortspielerei: ich sage, daß das Dioxyaceton in großen Konzentrationen die Zymase schädigt, die Autoren dagegen meinen, daß das Enzym früher abstirbt, als die ganze Menge des

---

1) l. c. S. 461.
2) l. c. S. 460.
3) l. c. S. 470.
4) l. c. S. 2935.
5) l. c. S. 471.
6) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 1780, 1910.
7) l. c. S. 471.

Dioxyacetons vergoren ist. Ich möchte an Versuche von Buchner und Klatte[1]) erinnern, die nachgewiesen haben, daß die Zymase nicht so leicht „abstirbt“, wie es die Autoren irrtümlich behaupten, da sie beim Zusatz des Koenzyms wieder wirksam wird.

Der einzige Versuch, den Harden und Young ausgeführt haben, sagt aber gar nichts, und den von ihnen gegebenen Kurven messe ich keinen großen Wert bei, da der Gang der Gärung vor allem von der Beschaffenheit des angewandten Saftes in hohem Grade abhängt. Das hängt wahrscheinlich von der relativen Menge und dem Zustande der im Safte befindlichen Enzyme ab. So haben z. B. Buchner und Meisenheimer eine langsame Angärung des Dioxyacetons bei ihren Versuchen immer beobachtet[2]), bei meinen aber setzte die Gärung des Dioxyacetons sofort nach dessen Zugabe ein.

Ich hatte schon die Gelegenheit, darauf hinzuweisen, daß die Rohrzuckerlösungen einmal sofort gären, einmal nur nach einiger Zeit; es gab sogar Fälle, wenn auch allerdings selten, wo die Gärung des Rohrzuckers erst nach 24 Stunden einsetzte[3]). Außerdem haben Harden und Young bei ihrem Versuche die Gärkraft des Saftes nicht angegeben, man darf aber nur die Säfte von ziemlich gleicher Gärkraft vergleichen, sonst kann man nicht in jeder Hinsicht übereinstimmende Resultate bekommen; aus diesem Grunde gebe ich bei meinen Versuchen immer die Gärkraft an.

Die Autoren haben zum „Vergleich der Gärungsmengen von Hexosephosphat allein und in Gegenwart von Zucker“ einige Versuche ausgeführt[4]), aus denen sie einen sonderbaren Schluß ziehen.

Meine Theorie, wie jede andere, soll vor allem dem Gesetze von Guldberg und Waage gehorchen. Dieses Gesetz ist leider den Autoren, wie ich nun sehe, unbekannt. Sie behaupten nämlich: „Nach Lebedews Theorie müßte die anfängliche Gärungsgeschwindigkeit des Hexosephosphats bei Ab- wie Anwesenheit des Zuckers gleich groß sein, da das Hexosephosphat unmittelbar der Bildung von Kohlensäure und Alkohol vorangeht[5]).

Es ist doch selbstverständlich, daß, wenn man die Konzentration des Zuckers erhöht, damit die Bildung des Zuckeresters begünstigt wird, was die Vermehrung der entwickelten Kohlensäuremenge zur Folge haben muß. Die katalytische Spaltung des Esters ist eine monomolekulare, die Bildung des Esters aus Zucker und Phosphorsäure, die von einem anderen Enzym besorgt wird, eine bimolekulare Reaktion. Die Geschwindigkeit der ersten Reaktion ist von der Konzentration des Esters unabhängig, die Geschwindigkeit der zweiten ist dagegen proportional

---

1) Diese Zeitschr. 8, 520, 1908.
2) l. c. S. 1780.
3) Ann. de l'Inst. Pasteur 26, 17, 1912.
4) l. c. S. 463.
5) Idem.

der Konzentration der beiden Komponenten. Es ist klar, daß die anfängliche Gärungsgeschwindigkeit bei An- und Abwesenheit des Zuckers keineswegs gleich sein soll, da bei der Spaltung des Hexosebiphosphats die freigewordene Phosphorsäure sofort verestert wird und die Menge des Zuckeresters konstant bleibt, bis der Zucker da ist. Wenn aber das Hexosebiphosphat sich allein in der Lösung befindet, so wird seine Menge mit der Zeit immer geringer.

Also wenn man nur mein erstes Schema in Betracht zieht, so ist auch in diesem Falle die Haltlosigkeit der Harden und Youngschen Erwiderung klar, bei meinem zweiten oben gegebenen Schema ist sie desto mehr jeder Bedeutung entkleidet, weil ich die direkte Vergärbarkeit des Glycerinaldehyds in Gemeinschaft mit N. Griaznoff gezeigt habe.

Harden und Young meinen, daß Zusatz des Phosphats keine beschleunigende Wirkung auf die Gärung des Dioxyacetons ausübt, obwohl sie keinen direkten Versuch zum Beweis dieser Behauptung ausgeführt haben! Wahrscheinlich darum sprechen sie sich so vorsichtig aus: „Bei der Vergärung des Dioxyacetons wird keine typische Phosphatbeschleunigung wie bei Hexose beobachtet[1].“ Dieser Behauptung kann ich leider nicht beipflichten, da ich bei meinen Versuchen gerade das Gegenteil, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der Rohrzuckergärung, konstatieren konnte[2].

Jedenfalls ist die Beobachtung von Harden und Young interessant, wenn sie sich bestätigt, daß verschiedene Säfte (von verschiedenen Hefearten) mit ungleicher Kraft das Dioxyaceton vergären, daß es sogar Säfte gibt, z. B. den Saft aus englischer obergäriger Hefe, die, „obgleich sie Glucose prompt vergären, Dioxyaceton gegenüber inaktiv sind“[3]. Nach meinem letzten Schema läßt sich vielleicht auch dieser Umstand erklären, und ich beabsichtige, diesbezügliche Versuche anzustellen.

Schließlich haben die Autoren zur Nachprüfung auch die Versuche über die Bildung von Phosphorsäureester während der Dioxyacetongärung ausgeführt. Darüber lese ich zu meinem großen Erstaunen: „Eine kleine Phosphatmenge ist auf diese Weise gebunden worden, somit ist die Gültigkeit von Lebedews Behauptung erwiesen[4].“

Man könnte nun glauben, daß ich keine direkten Versuche über das Verschwinden der freien Phosphorsäure bei der Gärung des Dioxyacetons angestellt habe; ich erlaube mir nun, die folgenden Zahlen, die ich aus meiner früheren Arbeit[5]) entnommen habe, hier wiederzugeben.

---

[1]) l. c. S. 477.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 2938, 1911.

[3]) l. c. S. 473.

[4]) l. c. S. 477.

[5]) l. c. S. 293[illegible].

Versuch 1.

Beim Anfang der Gärung	0,7431 g P_2O_5
Nach $1^1/_4$ Stunden	0,1339 „ „
„ $2^1/_4$ „	0,2535 „ „

Versuch 2.

Beim Anfang der Gärung	1,1907 g P_2O_5
Nach 1 Stunde und 25 Minuten . .	0,5292 „ „

Die Zahlen sprechen klipp und klar dafür, daß eine beträchtliche Menge der Phosphorsäure beim Anfang der Gärung verestert wird,

Wenn Harden und Young meine Arbeit aufmerksam gelesen hätten, so wären mehrere von ihnen ausgeführte Versuche überflüssig geworden, und sie hätten damit viel Zeit gespart. Übrigens bin ich ihnen dankbar, daß sie mir Gelegenheit gegeben haben, einige Streitpunkte hier klarzulegen.

Die Autoren schließen ihre ausführliche Arbeit mit folgenden Sätzen, auf die ich kurz antworte:

1. „Das Dioxyaceton vergärt in viel langsamerem Tempo als Zucker."

Das wurde von mir gezeigt.

2. „Dabei wird keine typische Phosphatbeschleunigung wie bei Hexose beobachtet."

Ich habe bei meinen Versuchen das Gegenteil konstatiert.

3. „Während der Gärung wird etwas freies Phosphat in eine organische Verbindung übergeführt."

Das wurde von mir gezeigt.

4. „Bei Zusatz von Phosphat zu einem Gemisch, bestehend aus Macerationssaft und Zucker, geht mit der schnell sich entwickelnden, dem zugefügten Phosphat entsprechenden Kohlensäuremenge eine äquivalente Hexosephosphatbildung einher."

Damit bin ich einverstanden, obwohl die Versuche nicht einwandfrei ausgeführt sind, da bei der Berechnung der entwickelten Kohlensäuremenge das Massenwirkungsgesetz wieder ohne Beachtung geblieben ist.

Zum Schlusse möchte ich meine heutigen Anschauungen über den Mechanismus der alkoholischen Gärung schematisch entwickeln.

Nach Lobry de Bruyn und Eckenstein lagern sich die Hexosen wechselseitig in der Lösung um, darum ist man berechtigt, von der Ketonhexose auszugehen:

CH_2OH		CH_2OH	Dioxyaceton
CO		CO	
CHOH	⟶	CH_2OH	
CHOH	⟵	COH	Glycerinaldehyd
CHOH		CHOH	
CH_2OH		CH_2OH	

Also ich nehme an, daß durch ein entsprechendes Enzym („Aldolase" oder „Hexotriase") die Aldolbindung ausgelöst wird. (Diese Reaktion bei gewissen Bedingungen kann auch umkehrbar verlaufen.) Wenn die gebildeten Produkte aus der Lösung auf diese oder andere Weise entfernt oder immobilisiert werden, so schreitet die Reaktion weiter vor; dabei wird Dioxyaceton wieder durch Verestern mit Phosphorsäure in Ketohexose kondensiert; das Glycerinaldehyd spaltet sich direkt. Zur Erklärung der Spaltung des Glycerinaldehyds in Kohlensäure und Alkohol ziehe ich die hervorragenden Untersuchungen von Neuberg[1]) und seinen Schülern über die zuckerfreien Gärungen, insbesondere über die Vergärung von Brenztraubensäure[2]), ebenso wie von Wieland über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge[3]) heran.

Ich stelle mir den Prozeß wie folgt vor:

1. $CH_2OHCHOHCOH - H_2O = CH_2 : C(OH)COH$[4])
2. $CH_2 : C(OH)COH + H_2O = CH_2 : C(OH)HC\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}$
3. $CH_2 : C(OH)HC\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix} - H_2 = CH_2 : C(OH)COOH$[5])
4. $CH_3COCOOH = CH_3COH + CO_2$
5. $CH_3COH + H_2 = CH_3CH_2OH$

Die Reaktionen 3 und 5 sind wahrscheinlich gekoppelte Reaktionen, die unter Mitwirkung eines Enzyms sich abspielen. „Wenn man, schreibt Wieland, feuchten Aldehyd bei Ausschluß von Luft mit Palladium schüttelt, so erhält man Säure und Wasserstoff, letzteren im Palladium gebunden:

$$R.HC\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix} \longrightarrow R.C\begin{matrix} O \\ OH \end{matrix} + H_2$$

Läßt man jetzt Luft zutreten, so wird der Wasserstoff verbrannt, und die Dehydrierung des Aldehydhydrats kann weiter gehen. Die Rolle des Luftsauerstoffs können hier auch Benzochinon, Methylenblau oder andere chinoide Verbindungen übernehmen"[5]).

In unserem Falle wird der Wasserstoff durch Acetaldehyd gebunden, und die Dehydrierung des Methylglyoxalhydrats durch ein spezifisches Enzym „Dehydrogenase" schreitet unbehindert weiter vor.

---

[1]) Diese Zeitschr. Eine Reihe von Mitteilungen **1911** u. **1912**.

[2]) Die Vergärbarkeit der Brenztraubensäure auch durch Hefepreßsaft und Hefemacerationssaft ist von C. Neuberg und S. Kurz bewiesen. Sitzungsber. d. Berl. Physiol. Ges. vom 1. März 1912; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 115 (Anm.), 1912.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 2606.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 320, 1878 (Brenztraubensäure aus Glycerinsäure).

[5]) l. c. S. 2607.

Nach oben angegebenem Schema der Spaltung des Glycerinaldehyds sollen die Zwischenprodukte Methylglyoxal[1]) und Brenztraubensäure sein. Da mit dem Macerationssafte zweimal stärkere Vergärung des Dioxyacetons und Glycerinaldehyds als mit dem Preßsafte erzielt werden kann, so hoffe ich, daß es mir gelingen wird, auch Methylglyoxal fast ebenso stark wie Glycerinaldehyd vergären zu lassen. Die vorläufigen Versuche, die ich bis jetzt ausgeführt habe, sind positiv ausgefallen und ich behalte mir vor, diese Versuche mit Macerationssaft fortzusetzen.

Über die Reduktion des Acetaldehyds durch Macerationssaft zum Äthylalkohol wird von mir und Griaznoff später berichtet werden.

---

[1]) C. Neuberg und J. Kerb (l. c.) haben erwogen, ob das Glycerin „bei einer etwaigen Cannizaro-Umlagerung des Methylglyoxals durch Hefe direkt aufträte“:

$$2\,CH_2 = C(OH){-}COH + 2\,H_2O \begin{cases} \rightarrow CH_2 = C(OH){-}COOH \\ \rightarrow CH_2OH{-}CHOH{-}CH_2OH\,; \end{cases}$$

das Glycerin könnte dann weiter die zur Reduktion erforderlichen 2 Wasserstoffatome liefern nach dem Schema:

$$C_3H_4O_3 + C_3H_8O_3 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH\,.$$

Es scheint mir aber, daß der von mir oben angegebene Weg viel wahrscheinlicher ist (dabei wird auch das Entstehen des Glycerins ebenso verständlich).

Zur Kenntnis der Salzsäurebildung im Magen.

Von

J. López-Suárez (Madrid).

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 27. Oktober 1912.)

Die nachstehenden Untersuchungen, die auf Vorschlag von Herrn Prof. Hofmeister unternommen worden sind, hatten zur Aufgabe, nähere Aufschlüsse über Ort und Vorgang der Salzsäurebildung in der Magenschleimhaut zu bringen. Dabei ging ich von der seit Heidenhain am meisten verbreiteten Vorstellung aus, daß die Bildung der Salzsäure eine Funktion der Belegzellen ist. Wider Erwarten haben sich Tatsachen ergeben, die dieser Vorstellung widersprechen, und daher einer Mitteilung wert sein dürften.

Der Ausgangspunkt meiner Versuche war folgende Überlegung. Bekanntlich tritt bei dem Versuche mit Scheinfütterung die reflektorisch ausgelöste Säuresekretion in wenigen Minuten ein und dauert bei entsprechender Weiterführung des Versuches stundenlang. Daß die ausgeschiedene Salzsäure in letzter Reihe aus den Chloriden des Blutplasmas bzw. der Lymphe stammt, steht außer Zweifel. Bei der Empfindlichkeit des lebenden Protoplasmas gegen Mineralsäuren ist es jedoch schwierig, zu denken, daß die Salzsäure, die sich hinterher im Magensaft findet, ursprünglich als solche präformiert in dem Zellprotoplasma enthalten ist, da erfahrungsgemäß ein entsprechend hoher Säuregrad alle Zellfunktionen eingreifend schädigt. Die Bildung der freien Salzsäure muß sonach erst außerhalb des eigentlichen Zellprotoplasmas bei oder nach Austritt des Sekretes erfolgen, und zwar aus einer im Protoplasma enthaltenen Vorstufe, die als solche indifferent ist und erst im Moment des Sekretionsvorgangs oder nachher unter HCl-Ab-

spaltung zerfällt. Diese Vorstufe könnte, da uns der Spaltungsvorgang selbst unbekannt ist, ein Chlorid — dann wahrscheinlich Kochsalz — oder irgendeine nicht ionisierte, leicht zersetzliche organische Chlorverbindung sein. Bei der Schnelligkeit, mit der die reflektorische Säuresekretion einsetzt, erschien es nicht unwahrscheinlich, daß diese chlorhaltige Vorstufe schon vor Sekretionsbeginn in den zugehörigen Zellen aufgespeichert ist, ähnlich, wie das für die Vorstufen der Fermente, z. B. für das Protrypsin, bekannt ist, und in diesem Falle war die Möglichkeit gegeben, näheres über die Lokalisation dieser HCl-Vorstufe zu erfahren.

Um dieser Frage näher zu treten, war es zunächst notwendig festzustellen, ob es überhaupt gestattet ist, eine Anreicherung der Fundusmucosa an Chlor anzunehmen. Da die Pylorusmucosa, wenn man von der Säurebildung absieht, sehr ähnliche Verhältnisse darbietet wie die Fundusschleimhaut, namentlich in Betreff der Zirkulation und der Benetzung mit Mageninhalt, so erschien sie als das passendste nnd nächstliegende Vergleichsobjekt.

I. Der Chlorgehalt der Fundus- und Pylorusschleimhaut.

Bei den einschlägigen Versuchen wurde Gewicht darauf gelegt, nur ganz frische und sorgfältig gereinigte Schleimhaut zu verarbeiten und vor allem die Beimengung von Mageninhalt auszuschließen. Der Chlorgehalt sollte auf Trockensubstanz bezogen werden. Dabei ergab sich aber die Notwendigkeit, das Chlor im frisch verarbeiteten Gewebe zu bestimmen, da die Schleimhaut beim Trocknen stets erhebliche Mengen Chlor verlor. Diese Erscheinung war bei chlorreichen Fundusschleimhäuten besonders stark ausgeprägt, fehlte aber auch der Pylorusmucosa nicht. Sie ist wohl darauf zurückzuführen, daß die postmortal auftretende autolytische Säurebildung Salzsäure aus Kochsalz oder anderen Chlorverbindungen frei macht und so bei anhaltendem Trocknen zu einem Chlorverlust führt.

Auf das Verdauungsstadium, in dem sich der Magen befand, habe ich bei den ersten Versuchen nicht Gewicht gelegt, so daß die einschlägigen Angaben der Tabelle unvollständig sind.

Die Technik war folgende: Ganz frischer Schweine- oder Hundemagen wird in fließendem Wasser mit einer Bürste, dann schnell mit

destilliertem Wasser (1 l) gut gewaschen. Dann wird Fundus und Pylorus getrennt, wobei ein zwischenliegender Streifen von etwa 3 cm entfernt wird. Hierauf folgt Trennung von Mucosa und Muscularis und sorgfältiges Abpräparieren der Schleimhaut, bis sie keine Spur mehr von Fett oder Bindegewebe enthält. Von beiden Schleimhäuten werden mehrere Proben gewogen, mit großen Mengen Soda-Salpetermischung vorsichtig verascht und zur Chlorbestimmung nach Volhard in der Modifikation von C. Arnold verwendet. Eine Probe von jeder Schleimhaut wird zur Wassergehaltsbestimmung bei 110° bis zu konstantem Gewicht getrocknet und nachher zur Bestimmung der Chlormenge verwendet. Die in Klammern beigesetzten Zahlen geben den Chlorgehalt des bei 110° getrockneten Gewebes an.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Tierart	Mageninhalt	Chlor in %				Differenz
			Fundus		Pylorus		
				Mittel		Mittel	
1	Schwein	—	0,87	0,87	0,67	0,67	0,20
2	„	Stark saurer Inhalt	0,56 0,69 (0,45)	0,62	0,55 0,63 (0,40)	0,59	0,03
3	Hund	Stark saurer Inhalt 7 Std. nach der Fütterung	0,72	0,72	0,68	0,68	0,04
4	Schwein	Magen leer. Sehr schwach saure Reaktion	0,70 0,80 (0,64)	0,75	0,43 0,46 (0,45)	0,44	0,31
5	Hund	Stark saurer Inhalt	0,59 0,60 (0,50)	0,59	0,50	0,50	0,09
6	Schwein	do.	0,5 0,6 (0,50)	0,60	0,50 (0,40)	0,50	0,10
7	„	Magen leer. Sehr schwach saure Reaktion	0,80 0,86 0,83 (0,64)	0,83	0,62 (0,54)	0,62	0,21
8	„	Stark saurer Inhalt; Beginn der Verdauung	0,73 0,78 (0,53)	0,75	0,58 (0,50)	0,58	0,17
9	Hund	Stark saurer Inhalt; 4 Std. nach der Fütterung	0,56 0,62 (0,46)	0,59	0,48 0,56 0,49	0,52	0,07
10	„	Stark saurer Inhalt; 14 Std. nach der Fütterung	0,51 0,63	0,57	0,43 0,47	0,45	0,12

Wie aus vorstehender Tabelle ersichtlich, enthält die Schleimhaut des Fundus durchschnittlich mehr Chlor als die des Pylorus. Zwar sind die Differenzen sehr ungleich, doch fallen sie alle nach einer Seite und gehen in der Mehrzahl der Versuche über die Fehlergrenzen hinaus.

Die Cl-Zahlen, soweit Kontrollanalysen vorliegen, zeigen nämlich Unterschiede von 0,01 bis 0,13 %, im Mittel von 0,07 %[1]), während die Differenzen zwischen Fundus und Pylorus unter 10 Versuchen siebenmal über diesen mittleren Fehler hinausgehen.

Da nach Macallum das Zellprotoplasma im allgemeinen wenig Chlor enthält, dieses vielmehr, wie auch aus anderen Erfahrungen hervorgeht, vorzugsweise in Blut und Gewebelymphe gefunden wird, so könnte der oben gefundene Unterschied vielleicht darin gesucht werden, daß der Fundus mehr Lymphe — Blut kommt, wie aus der Farbe der Schleimhaut zu entnehmen, überhaupt kaum in Betracht — enthält als der Pylorus. Wenn dies richtig ist, so müßte auch der Wassergehalt des Fundus ein entsprechend höherer sein.

Nun war der Wassergehalt von Fundus und Pylorus, wie aus nachstehender Tabelle hervorgeht, ziemlich gleich. Die beobachteten Unterschiede gehen den Differenzen im Chlorgehalt nicht parallel und sind bei weitem zu klein, um sie zu erklären.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Wassergehalt in %		Differenz
	Fundus	Pylorus	
1	81,10	81,10	0,00
2	79,37	80,01	− 0,64
3	80,63	79,20	+ 1,43
4	81,83	80,00	+ 1,83
5	78,40	76,00	+ 2,40
6	77,80	79,60	− 1,80
7	81,70	79,70	+ 2,00
8	77,21	75,21	+ 4,96
9	84,04	79,08	+ 4,96
10	79,76	77,95	+ 1,81

[1]) Diese Verschiedenheiten sind nicht notwendig durch Analysenfehler bedingt. Es kommt in Betracht, daß die entnommenen Schleimhautstücke unter sich nicht anatomisch gleich sind, z. B. mehr Drüsengewebe bzw. Bindegewebe, oder relativ mehr Haupt- bzw. Belegzellen enthalten können.

Eine andere Deutung könnte darin gesucht werden, daß im Fundus chlorhaltiges Sekret in dem Drüsenlumen enthalten war, während dem Pylorus ein solches fehlt. Diese anscheinend sehr plausible Deutung wird aber durch die Tatsache widerlegt, daß gerade die Fundusschleimhäute von ganz leeren und nur eine Spur saurer Reaktion darbietenden Mägen (Nr. 4 und 7) die allerhöchsten Chlorzahlen geliefert haben.

Da das Bindegewebe und die glatte Muskulatur ihrer geringen Menge wegen für eine Chlorspeicherung kaum in Betracht kommen, auch nicht abzusehen ist, in welcher Art sie die Cl-Verteilung beeinflussen sollten, so bleibt nur die Annahme übrig, daß es die am reichlichsten vertretenen morphologischen Elemente, die Drüsenzellen, sind, die im Fundus einen höheren Gehalt an Chlor besitzen als im Pylorus. Es liegt nahe genug, den höheren Chlorgehalt der Funduszellen mit der Salzsäurebildung im Fundus in Verbindung zu bringen. Das stimmt übrigens mit dem aus der Tabelle ersichtlichen Befund, wonach bei leerem Magen und im Beginn der Verdauung (Vers. 4, 7, 8) der höchste, auf der Höhe der Verdauung, bei reichlichem Gehalt des Magens an saurem Inhalt (Vers. 2, 3, 9) der niedrigste Chlorgehalt gefunden wurde. Denn nach Analogie mit anderen Sekretionsvorgängen ist zu erwarten, daß der Gehalt an den Sekretvorstufen, in diesem Falle an der die HCl liefernden Chlorverbindung, vor Beginn der Sekretion am höchsten sein wird und während der Sekretion abnimmt. Leider bin ich erst gegen Abschluß der Versuchsreihe auf dieses Verhalten aufmerksam geworden, so daß eine genaue Untersuchung darüber, ob der Chlorgehalt des Fundus von dem Stadium der Absonderung abhängt, einer weiteren Arbeit vorbehalten werden muß.

Immerhin kann ich eine Beobachtung anführen, die für die Aufspeicherung säurebildenden Materials im Fundus spricht. Frisch entnommene Magenschleimhaut vom Schwein, deren Oberfläche man sorgfältig von saurem Sekret befreit hat, zeigt bei Zimmertemperatur in der nächsten Zeit noch ausgesprochene Sekretion. Dieses Sekret ist in der Fundusregion stark sauer, in der Pylorusregion neutral. Bei Versuchen mit Schweinemagen ist die saure Reaktion der Fundusfläche nach $^1/_2$ Stunde sehr deutlich. Es mag zunächst dahingestellt bleiben, ob hier

eine postmortale Säurebildung vorliegt, oder nur ein Heraustreten von intra vitam gebildetem Sekret aus den Ausführungsgängen der Drüsen.

II. Über den Ort der Salzsäurebildung.

Die Beobachtung, daß der Fundus chlorreicher ist als der Pylorus, ließ es aussichtsvoll erscheinen, auf histologischem Wege festzustellen, ob es die Haupt- oder die Belegzellen sind, die vorwiegend Chlor enthalten.

Der Versuch, auf histologischem Wege den Ort der Salzsäurebildung festzustellen, ist bereits mehrfach gemacht.

Cl. Bernard[1]) und nach ihm Lépine[2]) und Heidenhain bemühten sich durch mikrochemische Reaktionen direkt im Gewebe freie Salzsäure nachzuweisen. Wie oben bemerkt, ist von vornherein nicht anzunehmen, daß bereits in den Zellen selbst merkliche Mengen Chlorwasserstoff auftreten. Dem entspricht auch das Ergebnis der Versuche der angeführten Autoren.

Cl. Bernard z. B. injizierte in die Jugularvene nacheinander Ferrilactat und Ferrocyankalium und tötete das Tier nach $^3/_4$ Stunden. In keinem Organ fand sich Berlinerblau, auch nicht in den Magendrüsen, obwohl auf der Magenschleimhaut, entsprechend der hier gegebenen sauren Reaktion, ein blauer Niederschlag vorhanden war. Sehrwald[3]) kam später zu einem anderen Resultat. Er brachte Schnitte des frischen Magens für einen Tag in eine Lösung von Ferrolactat, dann nach kurzem Waschen in Ferricyankaliumlösung. Die Schnitte waren nahezu überall, aber ungleich gefärbt. Die Belegzellen erschienen dunkelblau, die Hauptzellen nicht oder nur in den Drüsenhälsen oberflächlich gefärbt. Sehrwald schließt aus der Blaufärbung der Belegzellen auf deren saure Reaktion, sehr mit Unrecht, denn bei tagelangem Liegen der Schnitte in der Ferrolactatlösung müßte sich die Salzsäure, falls sie überhaupt vorhanden gewesen, durch Diffusion längst gleichmäßig in die Umgebung verbreitet haben. Wie unberechtigt die Sehrwaldsche Schluß-

---

[1]) Cl. Bernard, Leçons sur les propriétés physiologiques et les alterations pathologiques des liquides de l'organisme **2**, 375, 1859.

[2]) Lépine, Gaz. med. de Paris **1872**, 689.

[3]) Sehrwald, Münch. med. Wochenschr. **36**, 1889.

folgerung ist, geht übrigens daraus hervor, daß in seinen Präparaten Bindegewebe und Gefäßwandungen, zum Teil auch Blutkörperchen gute Blaufärbung aufwiesen. S. Fränkel[1]) hat schon darauf hingewiesen, daß das Eintreten der Reaktion in Sehrwalds Versuchen kein Beweis für die Anwesenheit von Säure ist. Ich selbst habe gelegentlich den Versuch Sehrwalds wiederholt und keine selektive Färbung der Belegzellen gesehen.

Zur entgegengesetzten Schlußfolgerung über den Ort der Säurebildung gelangte Mosse[2]) auf Grund der Beobachtung, daß sich die Hauptzellen Farbstoffen gegenüber als basophil, die Belegzellen als acidophil erweisen. Die Tatsache ist richtig und leicht zu bestätigen. Mit Hämatoxylin, Methylenblau usw. färben sich die Hauptzellen und ihre Kerne sehr viel stärker als die Belegzellen, die ihrerseits wieder Eosinfärbung annehmen. Aber die Folgerung, daß die Hauptzellen Säure produzieren, kann daraus nicht abgeleitet werden, da die Färbbarkeit des Protoplasmas bzw. seiner Proteinstoffe keinen Schluß auf die saure oder basische Natur eines davon nach außen abgegebenen Sekretstoffes gestattet.

Beweiskräftige Ergebnisse sind dagegen unter den richtigen Bedingungen von dem Nachweis des Chlors mit Hilfe von Silbersalzen zu erwarten. Greenwood[3]) hat bereits im Jahre 1885 Versuche mit Silberfärbung angestellt. Er fand, daß die Belegzellen stärkere Tinktion aufwiesen als die Hauptzellen und schloß daraus, daß die Belegzellen die Magensäure liefern. Indessen hat er den Umstand, daß auch Phosphate, Eiweißstoffe, Purinkörper, Fermentvorstufen usw. ebenfalls Silberniederschläge geben, nicht berücksichtigt, so daß seine Befunde auch eine andere Deutung zulassen.

Bei Gelegenheit seiner interessanten Arbeiten über die Verteilung von anorganischen Stoffen in tierischen und pflanzlichen Geweben hat nun in jüngerer Zeit Macallum[4]) die Silbertinktion so modifiziert, daß sie zum Nachweis von Chlor im

---

[1]) S. Fränkel, Arch. f. d. ges. Physiol. **48**, 63, 1891.

[2]) Mosse, Centralbl. f. Physiol. **17**, 1903.

[3]) Greenwood, Journ. of Physiol. **5**, 1884/85.

[4]) A. B. Macallum, Proc. Roy. Soc. **76** und **77**. Ergebn. d. Physiol. von Asher-Spiro **7**, 1908.

histologischen Präparat dienen kann. Das Verfahren beruht darauf, daß in salpetersäurehaltiger Lösung nur Chloride Silber fixieren, nicht aber Eiweißkörper, Phosphate und andere etwa sonst in Betracht kommende Stoffe. Das so erhaltene Chlorsilber läßt sich nachher durch Reduktion im Licht leicht nachweisen.

Ich habe versucht, das Verfahren von Macallum zur Entscheidung der Frage heranzuziehen, und zwar in folgender Form[1]): Ganz frische Mucosa wird mit wässeriger Lösung, die 1 % $AgNO_3$ und 1,5 % HNO_3 enthält, während 10 bis 20 Stunden behandelt. Dann wird mit destilliertem Wasser gewaschen, in Celloidin oder Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten. Die Schnitte werden mit Glycerin auf dem Objektträger fixiert und mehrere Stunden dem Sonnenlicht ausgesetzt.

Gegen unsere Erwartung ergab sich übereinstimmend in wiederholten Versuchen, daß die Belegzellen sich als fast ungefärbt, also chloridfrei oder sehr chloridarm erwiesen, während die Hauptzellen reichlich Silber fixiert hatten.

Damit ist bewiesen, daß die Hauptzellen im Gegensatz zu den Belegzellen einen Vorrat von Chlorverbindungen enthalten, und es wird damit sehr wahrscheinlich, daß sie als Bildungsstätte der Magensalzsäure anzusehen sind.

Im Hinblick darauf ist es erforderlich, die Beweiskraft der Beobachtungen und Erwägungen genauer zu untersuchen, die für die Lehre von der Säurebildung in den Belegzellen beigebracht worden sind.

Es sind das folgende:

1. Der Fundus sezerniert Salzsäure, der Pylorus nicht. Nun besitzt der Fundus Hauptzellen und Belegzellen, der Pylorus aber nur den Hauptzellen gleiche oder doch sehr ähnliche Elemente, somit ist die Salzsäurebildung auf die Belegzellen zu beziehen. Diese Schlußfolgerung steht oder fällt sonach mit dem Nachweis, daß die Hauptzellen des Fundus und die Pyloruszellen physiologisch identisch sind.

Ein solcher Identitätsnachweis ist aber nicht erbracht. Nicht einmal morphologische Gleichheit besteht, wie Langley

---

[1]) Die mikroskopische Untersuchuug habe ich im hiesigen pathologischen Institut ausgeführt. Es soll darüber später ausführlicher berichtet werden. Ich danke Herrn Prof. Chiari herzlich für seine liebenswürdige Unterstützung.

und Sewall u. a. gezeigt haben[1]). Man kann daher diesem Argument kaum Gewicht beilegen.

2. Nach v. Swięcicki[2]) und Heidenhain[3]) soll im Froschmagen mit seinen ausschließlich Belegzellen enthaltenden Drüsen nur Säurebildung stattfinden, das Pepsin aber in alkalischer Lösung durch den Oesophagus ausgeschieden werden. Abgesehen davon, daß inzwischen Langley gefunden hat (was ich bestätigen kann), daß der Froschmagen auch Pepsin sezerniert, ist eine Identifizierung der Säurezellen des Froschmagens mit den Belegzellen ganz unbegründet. Weder die histologische Anordnung nach Form und physiologisches Verhalten berechtigen zu einer solchen Annahme. Die Erfahrungen am Magen des Frosches zeigen im Gegenteil, daß Pepsin und Säure von denselben Drüsenelementen geliefert werden können.

3. Daß aus dem tinktoriellen Verhalten der Belegzellen ein Schluß auf ihr Säurebildungsvermögen nicht gezogen werden kann, ist bereits hervorgehoben worden. Auch die Tatsache, daß die Belegzellen auf Einwirkung von verdünnter Salzsäure bei Körperwärme zwar aufquellen, aber nicht wie die Hauptzellen zerfallen, beweist nur ihre größere Resistenz gegen Pepsinsalzsäure, nicht aber daß sie Säurebildner sind.

Wie bereits Oppel[4]) betont hat, ist aus den Versuchen Heidenhains und seiner Nachfolger wohl zu entnehmen, daß die Hauptzellen Pepsinbildner sind, sie lassen aber keinen Schluß darüber zu, ob die Belegzellen Säure, Pepsin oder überhaupt nur Wasser liefern.

Die neuere Beobachtung von Gmelin[5]), daß bei neugeborenen Hunden von den definitiven Zellformen der Fundusdrüsen bloß die Belegzellen vorhanden sind, obgleich um diese Zeit überhaupt keine Salzsäuresekretion besteht, spricht nicht für eine Säurefunktion der Belegzellen. Der oben angeführte Befund, daß sich mit Macallums Färbung Chlor wohl in den Hauptzellen, nicht aber in den Belegzellen nachweisen

---

[1]) Oppel, Lehrbuch der vergleich. Anatomie. I. Teil. Magen, Jena 1896.

[2]) v. Swięcicki, Arch. f. d. ges. Physiol. **18**, 444.

[3]) Heidenhain, Hermanns Handbuch d. Physiol. 5, 149.

[4]) Oppel, l. c.

[5]) Gmelin, Arch. f. d. ges. Physiol. **90**, 912.

läßt, spricht sogar entschieden dagegen. Die morphologischen Veränderungen der Belegzellen während des Sekretionsvorgangs und nach Pilocarpinvergiftung[1]) lassen sich sehr wohl mit der Annahme vereinigen, daß die Belegzellen unter dem direkten Einfluß der sekretorischen Nerven stehen und so auf die Menge des Magensaftes entscheidenden Einfluß haben. Ob aber das von ihnen gelieferte Sekret neben Wasser und Salzen physiologisch wirksame Bestandteile enthält, muß zunächst offen bleiben. Es ist dabei die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß dieses Sekret, wenn es auch nicht selbst fertige Salzsäure enthält, auf einem mehr indirekten Wege die Salzsäurebildung auslöst.

---

[1]) Noll und Sokoloff, Arch. f. Anat. u. Physiol. **1905**. Physiol. Abteilg.

Erwiderungen

von

Ivar Bang.

(Eingegangen am 19. Oktober 1912.)

1. Über „Agfa"-Lecithin.

In dieser Zeitschrift hat neulich Altschul[1]) gegen meine Charakterisierung des Agfa-Lecithins opponiert, indem er bemerkt, daß das Präparat nicht nach Bergells Verfahren dargestellt wird. Mein Urteil über das Präparat sei demgemäß irrtümlich. Diese Mitteilung ist für mich eine Überraschung, da ich seinerzeit, bevor ich in meinem Buche (Chemie und Biochemie der Lipoide) mein Urteil über das Präparat niederschrieb, mich direkt an die „Agfa"-Gesellschaft mit einem Schreiben wendete, in dem ich ganz offen fragte, ob das Präparat nach Bergell dargestellt worden war. Ich bekam auch von der Gesellschaft den Bescheid, daß dies sich so verhielte. (Des Wortlauts kann ich mich natürlich nicht erinnern, den Brief habe ich leider nicht aufbewahrt.) Wenn ich also nun höre, daß dies nicht richtig ist, trage ich nicht die Schuld.

Hiermit hat aber Altschul nicht erwiesen, daß das Agfa-Lecithin ein natives Phosphatid (oder mehrere) darstellt. Es wäre wohl besser gewesen, wenn er die Eigenschaften und chemische Zusammensetzung des Präparates hierfür als Belege mitgeteilt hätte.

2. Über die Guanylsäure.

In dem Journal of Biological Chemistry, Septemberheft 1912, teilen Levene und Jacobs eine Methode zur Darstellung der krystallisierten Guanylsäure mit. Die rohe Säure wird als Metallsalz niedergeschlagen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die freie Säure geht in Lösung und wird als krystallisiertes Brucinsalz niedergeschlagen.

Ich habe seinerzeit vergebens versucht, durch Brucin die Säure zur Krystallisation zu bringen. Levene und Jacobs haben also mehr Glück gehabt. Wenn die Verfasser aber folgern, daß die Säure eine einfache, der Inosinsäure entsprechende Verbindung darstellt, ist dies nicht be-

[1]) Altschul, diese Zeitschr. **44**, 505, 1912.

bewiesen. Sie haben übersehen, daß die Guanylsäure nicht oder jedenfalls nur sehr schwer diffusibel ist, was dagegen spricht. Weiter haben die Verfasser ohne weiteres die Guanylsäure in normaler Salzsäure gelöst, wir wissen aber aus den Arbeiten von Miescher, Schmiedeberg, Kossel u. a., daß z. B. die Thymusnucleinsäure sehr empfindlich gegen Säuren ist. Man hätte also erwarten sollen, daß die Verfasser überhaupt untersucht hätten, inwieweit dies mit der Guanylsäure der Fall ist. Zwar werden analytische Daten geliefert; hat doch Levene früher betreffs des Phytins recht merkwürdige Analysen des „reinen" Präparats angegeben, außerdem dreht meine Guanylsäure rechts (allerdings wurde das saure Natriumsalz polarisiert), während die Guanylsäure nach Levene und Jacobs linksdrehend ist. Ich bin also der Meinung, daß vielleicht die Verfasser nicht die Guanylsäure, sondern die Spaltungsprodukte untersucht haben. Man könnte sich auch vorstellen — wenn die Analysen richtig sind —, daß eine kompliziertere Guanylsäure in eine einfacher gebaute gespalten wäre.

Notiz über Physostigmin.

Von

Franz Eissler (Berlin).

(Eingegangen am 16. Oktober 1912.)

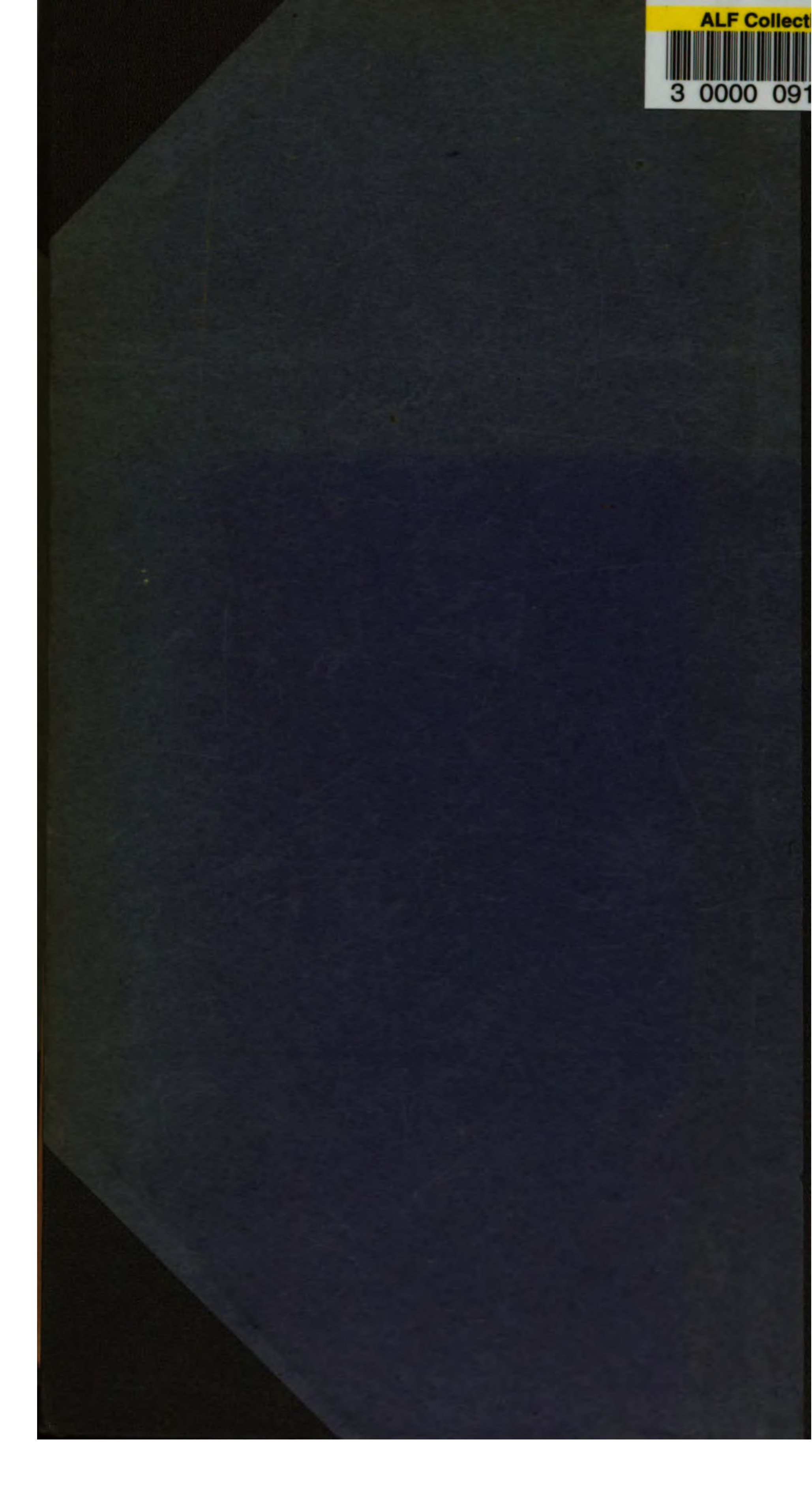
Im Anschluß an die interessante Untersuchung von A. H. Salway[1]) über die Konstitution des Physostigmins ist vielleicht eine Beobachtung, die ich vor einiger Zeit zu machen Gelegenheit hatte, nicht ganz ohne Interesse.

Physostigmin gibt mit diazotierter Sulfanilsäure in alkalischer Lösung einen prächtigen roten Farbstoff, mit dessen Untersuchung ich noch beschäftigt bin. — Die Bildung eines Diazofarbstoffes spricht in Übereinstimmung mit den Resultaten Salways, der bei der Zinkstaubdestillation Methylindol erhielt, ebenfalls für das Vorhandensein eines Pyrrolringes im Molekül des Physostigmins.

---

[1]) Journ. Chem. Soc. **101**, 978.

Autorenverzeichnis.


ALF Collect
3 0000 091